

# INAUGURAL – DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht – Karls – Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Biologe Andrej Peter Miotk  
aus Hannover

Tag der mündlichen Prüfung: .....



Thema

**Das WUSCHEL abhängige transkriptionelle Netzwerk  
und der molekulare Regulationsmechanismus in der  
pflanzlichen Stammzellkontrolle**

Gutachter: Prof. Dr. Jan Lohmann  
Prof. Dr. Joachim Wittbrodt



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>2</b>
<b>I. Einleitung .....</b>	<b>3</b>
I.1 Was sind Pflanzen? .....	3
I.2 Modell-Pflanze <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	5
I.3 Aufbau des apikalen Sprossmeristems.....	6
I.4 Molekulare Regulation des SAM .....	7
I.5 Der Transkriptionsfaktor WUSCHEL .....	10
I.6 Epigenetische Regulation des SAM .....	14
I.7 Zusammenfassung und Ziel der Arbeit.....	15
<b>II. Material .....</b>	<b>17</b>
II.1 Organismen .....	17
II.1.1 Pflanzen .....	17
II.1.2 Nematoden .....	18
II.1.3 Bakterienstämme .....	18
II.2 Vektoren .....	18
II.2.1 Standardvektoren .....	18
II.2.2 Konstrukte .....	18
II.3 Chemikalien .....	18
II.3.1 Antibiotika und Herbizide .....	18
II.3.2 Antikörper.....	19
II.3.3 Enzyme .....	19
II.3.4 Nukleotide/Nukleinsäuren.....	19
II.4 Kits .....	19
II.5 Medien .....	20
II.5.1 Medien zur Pflanzenzucht .....	20
II.5.2 Medien zur Bakterienzucht.....	20
II.5.3 Puffer und Lösungen.....	20
II.6 Geräte .....	23
II.7 Datensätze .....	24
II.8 Computerausstattung.....	25
<b>III. Methoden .....</b>	<b>26</b>
III.1 Arbeiten mit <i>Arabidopsis</i> .....	26
III.1.1 Kultivierung auf Erde .....	26
III.1.2 Kultivierung auf Platte .....	26

III.1.3 Ernte und Lagerung von Samen .....	27
III.1.4 Behandlung mit Chemikalien .....	27
III.1.5 Gewebepräparation.....	27
III.1.6 Pflanzen-Transformation .....	28
<b>III.2 Arbeiten mit DNA .....</b>	<b>28</b>
III.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> .....	28
III.2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	28
III.2.3 Quantitative PCR (qPCR) .....	29
III.2.4 Enzymatische Modifikation von DNA-Fragmenten.....	29
III.2.5 Agarose-Gelelektrophorese .....	29
III.2.6 Lineare DNA Amplifikation (LinDA) .....	30
III.2.7 DNA-Aufreinigung.....	30
III.2.8 Transformation in Bakterien.....	30
III.2.9 DNA-Sequenzierung.....	30
<b>III.3 Arbeiten mit RNA.....</b>	<b>31</b>
III.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen .....	31
III.3.2 Quantitative Reverse-Transkriptase PCR (qRT-PCR) .....	31
III.3.3 RNA-Seq .....	32
<b>III.4 Arbeiten mit Chromatin .....</b>	<b>32</b>
III.4.1 Chromatin-Immunopräzipitation .....	32
III.4.2 ChIP-Seq.....	34
<b>III.5 Mikroskopie .....</b>	<b>34</b>
<b>III.6 Bioinformatische Datenanalyse.....</b>	<b>34</b>
III.6.1 Microarray Analyse .....	34
III.6.2 ChIP-Seq Analyse .....	34
III.6.3 RNA-Seq Analyse.....	35
III.6.4 Meta-Analyse.....	35
III.6.5 Bild Analyse.....	36
<b>IV. Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
<b>IV.1 Aufreinigung Gewebe-spezifischer Zellkerne für ChIP-Seq.....</b>	<b>37</b>
IV.1.1 Gewinnung der Zellkernpopulation aus Gewebeextrakt durch Durchflusszytometrie .....	38
IV.1.2 Optimierung der Zellkernextraktion für die Gewinnung von Zelltyp-spezifischem Chromatin für ChIP-Seq .....	40
IV.1.3 Zelltyp-spezifische Kernaufreinigung.....	42
IV.1.4 Lineare Amplifikation von geringen DNA-Mengen für die Illumina-Sequenzierung.....	44
<b>IV.2 Die <i>WUS-GR</i> Pflanzenlinie: ein Modell zur chemischen Induktion der WUS Funktion .....</b>	<b>46</b>
IV.2.1 Phänotypische und transkriptionelle Charakterisierung der <i>WUS-GR</i> Linie .....	47
<b>IV.3 Analyse des molekularen Mechanismus der Genregulation durch WUS .....</b>	<b>53</b>
IV.3.1 Auffinden und Charakterisierung der WUS-Bindestellen im Genom.....	53
IV.3.2 Genomweite Identifikation von WUS-Zielgenen .....	57

IV.3.3 Analyse der WUS-abhängigen transkriptionellen Repression .....	62
IV.4 Die biologische Funktion der WUS-abhängigen Regulation .....	68
IV.4.1 Globale Charakterisierung der WUS-Zielgene .....	68
IV.5 Ähnlich und doch verschieden: Vergleich der WUS-Bindung mit anderen Transkriptionsfaktoren .....	77
<b>V. Diskussion .....</b>	<b>82</b>
V.1 Die <i>WUS-GR</i> Linie ist ein geeignetes Modell-System zur Charakterisierung des WUS-Effekts...	82
V.2 WUS interagiert Sequenz-spezifisch mit einer Vielzahl an offenen Promoterbereichen nahe des Transkriptionsstarts der Zielgene .....	84
V.3 WUS reguliert seine Zielgene über die Anpassung der Histon-Acetylierung .....	86
V.3.1 WUS als Repressor .....	87
V.3.2 WUS als Aktivator .....	88
V.4 WUS als „Dirigent“ des SAM .....	89
V.5 Modell zur Funktion von WUS in der Regulation des SAM .....	96
V.6 Perspektiven .....	98
<b>VI. Quellenverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>115</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>116</b>

## ABKÜRZUNGEN

In dieser Arbeit verwendete Abkürzungen werden im Text eingeführt oder sind gängige physikalische Einheiten. Zusätzlich werden Abkürzungen der Gennamen entsprechend der *Arabidopsis Information Resource* (TAIR) verwendet. Gene werden *kursiv* und Genprodukte normal geschrieben, Mutanten in Kleinbuchstaben. Nukleinsäuren werden gemäß der UIPAC-Konvention abgekürzt. Die nachfolgende Liste gibt einen Überblick über die meisten Abkürzungen im Text.

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
ABA	Abscisinsäure
BL	Brassinolid
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
Cyclo	Cycloheximid
CZ	Zentrale Zone
d.h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEX	Dexamethason
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAO	Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen
GA	Gibberellinsäure
GBB	Galbraith Puffer
GOE	Großer Oxidationsevent
H2B	Histon 2B
H3K27	Histon 3 Lysin 27
H3K9	Histon 9 Lysin 9
H3Kac	Histon 3 Lysin Acetylierung
HD	Homöodomäne
HDAC	Histon Deacetylase
IAA	Indol-3-Essigsäure
L1-3	Layer 1-3
LinDA	Lineare DNA Amplifikation
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MJ	Methyljasmonat
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NAA	1-Naphthylessigsäure
NPA	N-(1-Naphthyl)phthalsäuremonoamid
NPP	Nettoprimärproduktion
OC	Organisierendes Zentrum



PCA	Hauptkomponentenanalyse
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PZ	Periphere Zone
QC	Ruhendes Zentrum
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RAM	Apikales Wurzelmeristem
RM	Rippenmeristem
RNA	Ribonukleinsäure
SAM	Apikales Sprossmeristem
SDS	Natriumdodecylsulfat
Seq	Illumina-Sequenzierung
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
TSA	Trichostatin A
TSS	Transkriptionsstart
TTS	Transkriptionsterminationsstelle
ü.N	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
v.a.	vor allem
WRS	WUS Regulationsscore
YFP	Gelbfluoreszierendes Protein
z.B.	zum Beispiel



## ZUSAMMENFASSUNG

Pflanzen bilden nahezu alle oberirdischen Strukturen wie Blätter und Blüten post-embryonal. Hierzu besitzen sie eine Stammzellpopulation in einer speziellen Nische am Sprossapex, dem sogenannten apikalen Sprossmeristem (SAM). Durch Teilung der sich selbst erhaltenden Stammzellen entstehen Tochterzellen, die in die Peripherie des SAM verdrängt und dort in Blatt- und Blütenprimordien aufgenommen werden. Die einzelnen Bereiche des SAM werden durch verschiedene molekulare Signale definiert und stehen über Signalpeptide, Hormone und mobile Transkriptionsfaktoren miteinander in Kontakt. Von entscheidender Bedeutung für den Erhalt der Stammzellpopulation ist der Transkriptionsfaktor WUSCHEL (WUS). Er wird in den Zellen direkt unterhalb der Stammzellen exprimiert und definiert so das Organisierende Zentrum (OC). Vom OC gelangt er als Protein durch cytoplasmatische Verbindungen, den Plasmodesmata, in die Stammzellen. Seine Funktion in den Stammzellen ist notwendig, um ihre Identität zu erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die molekularen Grundlagen und das Potential der WUS-abhängigen Genregulation in *Arabidopsis thaliana* untersucht.

Durch die Erzeugung eines umfassenden Datensatzes aus DNA-Bindedaten, Transkriptom- und Epigenomdaten, konnte das globale Genregulationspotential von WUS untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass WUS mehrere Tausend Gene direkt, durch Sequenz-spezifische Interaktion mit deren Promoter, regulieren kann. Die duale Funktion als Aktivator und Repressor konnte bestätigt werden. Wie seit langem vermutet, konnte hier erstmals global gezeigt werden, dass die Repressor-Funktion über eine Histon-Deacetylase (HDAC) vermittelte Reduktion des Acetylierungszustands der Genloci erfolgt. Zusätzlich konnten Hinweise gefunden werden, die auf eine ebenfalls HDAC-vermittelte Transkriptions-Aktivierung hindeuten. Bei großer Ähnlichkeit in den Bindeprofilen unterscheiden sich die Regulationsprofile von WUS und anderen Transkriptionsfaktoren deutlich. WUS wirkt v.a. auf die Expression von Transkriptionsfaktoren und reguliert biologische Prozesse wie Differenzierung und Signaltransduktion. Die direkte Regulation der verschiedenen Signaltransduktionskomponenten in den Hormon-Signalwegen spricht für eine bedeutende Funktion von WUS als Koordinator des Hormongleichgewichts im SAM. Anhand des Pflanzenhormons Auxin wird ein Modell für die WUS-abhängige Musterbildung im SAM entwickelt.

## ABSTRACT

Almost all aerial parts of plants, like leaves and flowers, are generated post-embryonically. For this, plants harbor a pool of stem cells in a specialized niche at the shoot apex, the so-called shoot apical meristem (SAM). Division of the self-maintaining stem cells generates daughter-cells, which are displaced to the periphery, where they become integrated into leaf and flower primordia. The different zones of the SAM are defined by diverse molecular signals, and interconnected via signal peptides, hormones, and mobile transcription factors. Of critical importance for the maintenance of the stem cell population is the transcription factor WUSCHEL (WUS). Its expression directly underneath the stem cells defines the organizing center (OC). From the OC it moves via cytoplasmic bridges, the so-called plasmodesmata, into the stem cells. The WUS function is necessary for the maintenance of the stem cell identity. In context of this study the molecular basis and the potential of WUS dependent gene regulation was assessed in the model plant *Arabidopsis thaliana*.

The generation of a comprehensive dataset of DNA-binding, transcriptome, and epigenome data provided a platform for the study of the global WUS gene regulation potential. It could be shown that WUS can regulate thousands of genes by sequence-specific interaction with their promoters. Its dual function as activator and repressor was confirmed. The long proposed repressor function by histone-deacetylase (HDAC) mediated reduction of the target loci acetylation state could be globally revealed herein for the first time. Additional points of evidence implicate an HDAC-function in the trans-activation, too. Despite strong similarity between the binding profiles of WUS and other transcription factors, their regulation profiles are distinct. WUS acts mostly on the expression of transcription factors and regulates biological processes, like differentiation and signal transduction. The direct regulation of several signal transduction components in hormone signaling pathways indicates a prominent role for WUS as coordinator of the hormone equilibrium in the SAM. Exemplified by the plant hormone auxin, a model for the WUS dependent pattern formation in the SAM is proposed.

# I. EINLEITUNG

Die Erde wird als der Blaue Planet bezeichnet, da ihre Oberfläche zu über 70% von Wasser bedeckt ist und sie daher vom Weltall aus blau erscheint (siehe *Blue Marble*: Schmitt, 1972). Doch nicht nur vom Weltall aus entsteht dieser Eindruck. Durch die Rayleigh-Streuung bekommt die Erdatmosphäre ebenfalls ihre charakteristische Farbe. Gleichzeitig könnte man sie aber auch wegen ihrer Pflanzendecke als den Grünen Planeten bezeichnen.

Die Erdatmosphäre enthält relativ konstante 21 Volumenprozent Sauerstoff (Lyons et al., 2014). Dieser freie verfügbare Sauerstoff ist notwendig für biochemische Oxidationsprozesse, wie der Atmungskette, und ist damit eine Lebensgrundlage für einen Großteil der Organismen auf der Erde (Campbell und Reece, 2010). Es mag daher überraschen, dass die Sauerstoffkonzentration während der ersten Hälfte der Erdgeschichte nicht einmal 0,001% der heutigen Konzentration betrug und dann innerhalb eines vergleichsweise kurzen Zeitraums, zwischen 2,4 bis 2,1 Milliarden Jahren, schlagartig auf vergleichbare Konzentrationen wie heute anstieg. Dieses Ereignis wird als Großer Oxidationsevent (GOE) bezeichnet. Was genau zum GOE führte, ist noch unklar und Gegenstand wissenschaftlicher Debatte, unstrittig ist jedoch, dass die Photosynthese praktisch die Quelle des gesamten Sauerstoffs in der Atmosphäre ist (Lyons et al., 2014).

Bei der Photosynthese entsteht durch Photolyse des Wassers Sauerstoff als Nebenprodukt der Fixierung von Kohlendioxid aus der Luft (Sitte, 2002). Die Gewinnung von Kohlenstoff für den Kohlenstoff-Zyklus durch Photosynthese wird als Nettoprimärproduktion (NPP) bezeichnet und ist ein Maß für die Photosyntheseaktivität. Sie ist im Meer und an Land etwa gleich groß und geht jeweils fast vollständig auf Phytoplankton und Landpflanzen zurück (Field et al., 1998). Phytoplankton besteht neben Protisten und Cyanobakterien v.a. aus Grünalgen (Sitte, 2002). Die für uns lebensnotwendige Atmosphäre des grünen Planeten mit ausreichender Sauerstoffkonzentration verdanken wir also größtenteils grünen Pflanzen. Aber was genau sind Pflanzen?

## I.1 Was sind Pflanzen?

Aus systematischer Sicht entsprechen Pflanzen der monophyletischen Gruppe der *Embryophyta* innerhalb der Domäne der Eukaryonten und dem „Reich“ der *Archaeplastida*. Zusammen mit den verschiedenen Grünalgen bilden sie die *Chloroplastida*, die sich durch primäre Plastiden mit den Chlorophyllen a und b, Cellulose in den Zellwänden und echte Stärke als Speicher auszeichnen (Adl et al., 2012). Von den geschätzt 300 000 bis 315 000 bekannten Pflanzenarten gehören 260 000 bis 290 000 zu den Samenpflanzen (Russell und Cohn, 2012). Die Samenpflanzen (*Spermatophyta*) machen somit den größten Teil der bekannten Pflanzen aus. Sie werden unterteilt in Nack- (*Gymnospermae*) und Bedecktsamer (*Angiospermae*) (Sitte, 2002). Im Nachfolgenden bezieht sich der Begriff Pflanze vereinfachend auf die Gruppe der Samenpflanzen.

Pflanzen sind, in grober Annäherung, multizelluläre Organismen aus eukaryontischen Zellen mit charakteristischen Zellwänden aus Cellulose, mit einer Vaskulatur für den Wasser- und Nährstofftransport und einem oberirdischen Anteil, dem Spross und der unterirdischen Wurzel. Während die Wurzel für die Aufnahme von Wasser und Nährstoffen aus dem Boden und für die Speicherung von Energie, z.B. in Form von Stärke, genutzt wird, ist der Spross verantwortlich für die Energiefixierung durch Photosynthese. Er erscheint zu großen Teilen grün, da die Photosynthese-Pigmente rotes und blaues Licht absorbieren und nur grünes Licht reflektiert wird. Pflanzen entwickeln während ihres Lebens zwei Generationen, den vegetativen Sporophyten und den reproduktiven Gametophyten, der bei Angiospermen in reduzierter Form in die Blüte integriert vorliegt. Auch zeitlich lässt sich bei vielen Pflanzen eine vegetative von einer reproduktiven Phase unterscheiden (Sitte, 2002).

Während die ersten Vorläufer der modernen Pflanzen bereits vor etwa 450 Millionen Jahren im Ordovizium auftraten, stammen die frühesten Fossilien von Samenpflanzen aus dem späten Devon (Rothwell et al., 1989) Echte Blüten, und damit die *Angiospermae*, entstanden erst im Kreidezeitalter (Sitte, 2002). Bis heute sind Pflanzen sehr erfolgreich und haben die meisten Lebensräume erobert. Viele Landschaften, wie der tropische Regenwald, Savannen, Steppen oder der boreale Nadelwald, werden durch die dort vorkommenden Pflanzen charakterisiert.

Das Trockengewicht der gesamten Pflanzenbiomasse wird dabei auf  $10^{12}$  t geschätzt. Davon werden jedoch beeindruckende 10% jedes Jahr durch Photosynthese neu gewonnen. Hierzu werden nur etwa 0,02% der einfallenden Sonnenenergie ( $173 \times 10^{15}$  W) verbraucht. Dadurch gelingt es Pflanzen jährlich Biomasse mit einem Energieinhalt von schätzungsweise  $10^{21}$  J zu generieren, was der dreifachen Menge der durch den Menschen verbrauchten Energie (Stand 2003) entspricht (alle Daten nach: Heldman, 2003). Berücksichtigt man, dass die fossilen Rohstoffe ebenfalls auf Pflanzenbiomasse zurück gehen, wird deutlich, wie fundamental wichtig Pflanzen für das menschliche (Über-)leben sind.

Aber auch als Nahrungsmittel spielen Pflanzen eine herausragende Rolle. Im 1995 erschienenen „Atlas zu Nahrung und Landwirtschaft“ hat die Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (FAO) Kennzahlen zur Bedeutung von Pflanzen für die menschliche Ernährung zusammengetragen (Loftas und Ross, 1995). Gegen Ende des letzten Millenniums bestand der weltweit durchschnittliche Speiseplan zu fast zwei Dritteln direkt aus Pflanzen und Pflanzenprodukten. Auch wenn tierische Produkte in Westeuropa mit 33% (Getreide 26%, Knollen und Wurzeln 4%) gegenüber Afrika mit 7% (Getreide 46%, Knollen und Wurzeln 20%) einen deutlich höheren Anteil auf dem durchschnittlichen Speiseplan darstellen, beruhen auch tierische Nahrungsmittel doch letztlich auf Pflanzen als Futtermittel. Interessant ist, dass gerade einmal 15 Kulturpflanzen aus über 50 000 essbaren Pflanzen, für 90% der weltweiten Energieversorgung durch Pflanzen verantwortlich waren. Davon machten Reis, Mais und Weizen zwei Drittel aus. Auch wenn es einige Veränderungen im Laufe der letzten zwanzig Jahre gegeben haben dürfte, so steht die

Bedeutung von Pflanzen für die direkte Nahrungsversorgung der Menschheit nach wie vor außer Frage.

Aber nicht nur ihre Bedeutung als Rohstoff und Nahrungsmittel macht Pflanzen zu lohnenswerten Forschungsobjekten. Im Laufe der Evolution sind Pflanzenarten entstanden, die wahre Meisterleistungen erzielen können. Der massenmäßig größte Organismus der Welt ist eine Amerikanische Zitterpappel (*Populus tremuloides*) mit einem Gesamtgewicht von über  $6 \times 10^6$  kg (Mitton und Grant, 1996). Er stellt einen ganzen Wald aus einzelnen, etwa 130 Jahre alten Bäumen dar, die alle Klone eines einzigen Baumes sind, der vor etwa einer Million Jahren lebte. Auch einzelne Pflanzen können ein stattliches Alter erreichen. So fand man ein Exemplar der Langlebigen Kiefer (*Pinus longaeva*), das über 5 000 Jahre alt ist (Munné-Bosch, 2014). Auch beim Größenwachstum gibt es Extreme. So werden Individuen des Küstenmammutbaums (*Sequoia sempervirens*) bis über 110m hoch (Koch et al., 2004). Diese Rekordleistungen wirken umso beeindruckender, wenn man die Keimlinge der Pflanzen betrachtet. Nach der Keimung besteht der Keimling lediglich aus embryonalen Blättern (Kotyledonen) und Anlagen der ersten echten Blätter, embryonalem Stängel (Hypokotyl) und kurzer embryonaler Wurzel. Alle ober- und unterirdischen Strukturen und Organe entwickeln sich erst post-embryonal durch die kontinuierliche Aktivität von Stammzellzentren an den Wachstumsspitzen der Wurzel und des Sprosses sowie zwischen der Vaskulatur im Kambium (Weigel und Jürgens, 2002). Mit Hilfe der Stammzellzentren kann die Pflanze nicht nur zu stattlicher Größe heranwachsen, sondern auch verletzte Organe ersetzen und, als sessiler Organismus, auf Umweltbedingungen reagieren. Die Stammzellen befinden sich jeweils in einer speziellen Mikroumgebung, dem sogenannten Meristem, das für ihren Erhalt und ihre Funktion notwendig ist. Das primäre apikale Sprossmeristem (SAM) ist verantwortlich für die Entstehung aller oberirdischen Strukturen und Organe, inklusive des Sprosses und der Blätter, und während der reproduktiven Phase der Blüten. Aus dem primären apikalen Wurzelmeristem (RAM) entsteht die gesamte Primärwurzel (Weigel und Jürgens, 2002; Laux, 2003). Die Stammzellen des Kambiums bilden ein sekundäres Meristem, das für das Dickenwachstum der Pflanze verantwortlich ist (Jouannet et al., 2015).

## **I.2 Modell-Pflanze *Arabidopsis thaliana***

Seit Ende des letzten Jahrhunderts hat sich die Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*), aus der Familie der Kreuzblütler (*Brassicaceae*), als Modell-System für die genetische und molekulare Untersuchung in Pflanzen durchgesetzt. Ihr vergleichsweise kleines, auf fünf Chromosomen verteiltes, Genom von etwa 120Mbp liegt in hoher Auflösung als Sequenz vor. Alle kodierenden Bereiche sind annotiert und für den größten Teil gibt es Mutantenlinien. Als selbstbefruchtende Pflanze mit einem diploiden Chromosomensatz ermöglicht sie schnelle genetische Untersuchungen. Neben dem sehr gut annotierten Genom, bietet *A. thaliana* den Vorteil, dass die meisten molekularbiologischen Methoden, insbesondere die Transformation durch *Agrobacterium*, angewendet werden können. Die Pflanze vollendet ihren Lebenszyklus innerhalb von nur sechs Wochen und liefert Tausende von Samen pro

Individuum. *A. thaliana* kommt als Ökotypen, Standort angepasste Varietäten, an verschiedenen Standorten in der Moderaten Zone der nördlichen Hemisphäre vor. Dank der großen wissenschaftlichen Gemeinschaft liegt umfangreiche Literatur zur Funktion von molekularen Prozessen und Genen vor (Meinke et al., 1998). Daher erfolgten alle Untersuchungen in dieser Arbeit ausschließlich an der Modell-Pflanze *Arabidopsis thaliana*.

### **I.3 Aufbau des apikalen Sprossmeristems**

Das SAM der Modell-Pflanze *Arabidopsis thaliana* befindet sich am oberen Ende des Sprosses und ist nur wenige zehntel Millimeter groß. Es entwickelt sich bereits während der Embryogenese. In der Peripherie des kuppelförmigen Meristems entstehen die Anlagen der neuen Organe, die sogenannten Primordien. Durch sie wird das SAM gegen mechanische Schäden geschützt.

Das SAM wird durch drei klonal unabhängige Zellschichten gebildet und lässt sich in drei funktionell unterschiedliche Domänen unterteilen (Satina et al., 1940; Steeves und Sussex, 1989). Die Tunica wird durch die äußerste Zellschicht (L1, die Epidermis) und die direkt darunter liegende Zellschicht (L2) gebildet und umgibt den Corpus (L3), der aus den Zellen des Inneren der Pflanze besteht (Lüttge und Kluge, 2002). Während sich die Zellen der L1 und L2 ausschließlich antiklinal teilen, d.h. im rechten Winkel zur Oberfläche, gibt es keine bevorzugte Teilungsrichtung in der L3. Die drei Zellschichten bilden somit eigenständige, unabhängige Populationen (Gaillochet et al., 2015). Klonale Analysen konnten zeigen, dass jede Zellschicht auf die Aktivität von zwei bis drei Stammzellen zurückgeführt werden kann (Stewart und Dermen, 1970). Diese Stammzellen befinden sich jeweils am äußersten Scheitelpunkt des SAM in einem Bereich, der durch die Expression des Gens *CLAVATA3* (*CLV3*) charakterisiert ist (Trost et al., 2014). Er wird auch als Zentrale Zone (CZ) bezeichnet und wird durch die Zellen der Peripheren Zone (PZ) flankiert. Unterhalb befindet sich das sogenannte Rippenmeristem (Steeves und Sussex, 1989). Während sich die Zellen der CZ nur selten teilen (alle 36 bis 72 Stunden), ist die Teilungsrate in der PZ deutlich höher (Reddy et al., 2004). Hier werden die Zellen erzeugt, die, durch laterale Verdrängung über den Grenzbereich des Meristems hinaus, für die Bildung neuer Organe am Rand des Meristems benötigt werden. Diese Abfolge von sich selten teilenden Stammzellen, sich oft teilenden Übergangszellen und schließlich differenzierendem Gewebe ist vergleichbar mit tierischen Stammzellnischen (Gaillochet und Lohmann, 2015). Den obersten Teil des Rippenmeristems bildet das Organisierende Zentrum (OC). Es ist durch die Expression des Gens *WUSCHEL* (*WUS*) charakterisiert und erhält die Identität der darüber liegenden Stammzellen auf nicht Zell-autonome Weise (Mayer et al., 1998). Obwohl die individuellen Zellen des OC ständig durch die Teilung der darüber liegenden Stammzellen aus dieser Region verdrängt werden, bleibt die Position des OC jedoch konstant. Selbst nach einer vollständigen mikrochirurgischen Entfernung von CZ und OC regeneriert die Pflanze die ursprünglichen Domänen durch Re-Spezifizierung von Zellen der PZ (Reinhardt et al., 2003). Über die klonale Identität der Zellschichten hinaus spielen daher offen-



sichtlich relative Positionssignale eine entscheidende Rolle bei der Spezifizierung der jeweiligen Zellidentitäten. Die molekularen Grundlagen dieser Signale sind bislang nur teilweise verstanden.

## I.4 Molekulare Regulation des SAM

Von zentraler Bedeutung für den Erhalt der Stammzellidentität ist der Homöodomäne-Transkriptionsfaktor *WUS*, der im OC exprimiert wird (Mayer et al., 1998). Das Protein wandert auf symplastischem Weg, durch Plasmodesmata, spezifisch in die darüber liegenden Zellen der CZ und erhält deren undifferenzierten Zustand (Daum et al., 2014; Yadav et al., 2011). Die Stammzellen wiederum signalisieren ihre Anzahl zurück an das OC, indem sie das kleine Peptid CLV3 sekretieren (Fletcher et al., 1999). Die Expression von *CLV3* ist daher ein Marker für Stammzellidentität. Das Glykopeptid wird in den interzellulären Raum sekretiert und dort von der ektodermalen Domäne der *leucin-rich repeat (LRR) receptor-like kinase* CLAVATA1 (CLV1) gebunden (Rojo et al., 2002; Clark et al. 1997; Ogawa et al., 2008). Außerdem wird das CLV3-Signal auch über einen Komplex aus CLAVATA2 (CLV2) und CORYNE (CRN), sowie durch RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE2 (RPK2) wahrgenommen (Bleckmann et al., 2009; Kinoshita et al., 2010). Durch Signaltransduktionsprozesse, die die Aktivität von heterotrimeren Guanosintriphosphat-Bindeproteinen und mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) beinhalten, über die sonst aber noch wenig bekannt ist, wird die Expression von *WUS* im OC reprimiert (Bommert et al., 2013; Ishida et al., 2014; Betsuyaku et al., 2011). Zwischen *WUS* und *CLV3* besteht somit eine negative Rückkopplungsschleife die notwendig für die Stammzellhomöostase ist (Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000). Gleichzeitig reguliert die Aktivität dieser Rückkopplungsschleife die Zellzyklusaktivität in der PZ, wobei *WUS* die Teilungsrate erhöht (Reddy und Meyerowitz, 2005; Yadav et al., 2010).

Parallel zu *WUS* ist die Aktivität von SHOOTMERISTEMLESS (STM) für die Funktion des Meristems und den Erhalt einer Stammzellpopulation entscheidend (Endrizzi et al., 1996). *STM* kodiert für einen Transkriptionsfaktor der *KNOTTED-like homeobox (KNOX)* Genfamilie (Long et al., 1996). Er hat überlappende Aktivität mit KNOTTED1-LIKE HOMEBOX GENE6 (KNAT6) und BREVIPEDICELLUS (BP) und reprimiert die beiden Differenzierungsfaktoren *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)* und *AS2* im Bereich des gesamten Meristems (Belles-Boix et al., 2006; Byrne et al., 2002). Diese wiederum bilden einen Dimer und reprimieren die Expression der KNOX-Gene (Byrne et al., 2000; Guo et al., 2008). Durch diese antagonistische Wirkung wird die Differenzierung der Zellen innerhalb des Meristems verhindert, während sie innerhalb der Primordien differenzieren können. Eine weitere wichtige Funktion von STM ist das Ankurbeln der Cytokinin Biosynthese durch die Aktivierung der *ISOPENTENYLTRANSFERASE7 (IPT7)*, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Cytokinin-Anabolismus katalysiert (Yanai et al., 2005; Jasinski et al., 2005; Kakimoto, 2001; Takei, 2001).

Cytokinine sind eine Gruppe von N<sup>6</sup>-substituierten Adenin-Derivaten die als Pflanzenhormone wirken und eine Vielzahl von Entwicklungs- und Wachstumsaspekten der Pflanze regulieren (Kieber und Schaller, 2014). Im SAM fördert Cytokinin nicht nur die Expression von *WUS*, sondern unterstützt auch die Zellproliferation durch Regulation der Zell-Zyklus-Komponente CYCLIN D3 (CYCD3) (Gordon et al., 2009; Riou-Khamlichi et al., 1999). Die Wahrnehmung und Signaltransduktion von Cytokinin erfolgt über ein *Phospho-Relay*, ähnlich der bakteriellen Zwei-Komponenten Signaltransduktion (Kieber und Schaller, 2014; Schaller et al., 2011). Es gibt drei *ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE (AHK)* Gene die als Rezeptoren für Cytokinin fungieren (Inoue et al., 2001; Suzuki et al., 2001; Ueguchi et al., 2001; Yamada et al., 2001). Sie befinden sich v.a. in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER), mit der Rezeptordomäne im extracytoplasmatischen Raum und der Empfängerdomäne im Cytosol (Caesar et al., 2011). Durch Bindung von Cytokinin wird eine Autophosphorylierung an einem konservierten Histidin im cytosolischen Teil der Rezeptorkinase ausgelöst, gefolgt vom Transfer des Phosphates in die Empfängerdomäne (Inoue et al., 2001; Suzuki et al., 2001; Ueguchi et al., 2001; Yamada et al., 2001). Von dort wird es auf eines der fünf *ARABIDOPSIS HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER (AHP1-5)* Proteine übertragen, die als Transferproteine dienen (Suzuki et al., 2000). Die erste transkriptionelle Reaktion erfolgt nach Aktivierung der *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS (ARR)* des Typs-B durch Übertragung des Phosphats auf deren Empfängerdomäne (Schaller et al., 2008). Zu den als erstes transkribierten Genen zählen die Typ-A *ARRs*, die im Gegensatz zu Typ-B *ARRs* keine Transkriptionsfaktor-Aktivität aufweisen (D'Agostino et al., 2000). Sie werden ebenfalls durch AHPs phosphoryliert und sind größtenteils Repressoren des Cytokinin-Signaltransduktionswegs (Dortay et al., 2006; Kiba et al., 2003; To et al., 2004; Leibfried et al., 2005; Lee et al., 2007; To et al., 2007). Durch ihre Aktivität ergibt sich eine negative Rückkopplungsschleife in der Cytokinin-Signaltransduktion.

*WUS* greift an diesem Punkt an, indem es verschiedene Typ-A *ARRs* direkt reprimiert und somit die Cytokinin-Signaltransduktion verstärkt (Leibfried et al., 2005). Gleichzeitig wird die Expression von *WUS* durch Cytokinin verstärkt (Gordon et al., 2009).

Die Cytokinin-Verteilung innerhalb des SAM wird durch die Aktivität von Biosynthese- und katabolischen Enzymen reguliert (Kieber und Schaller, 2014). Cytokinin wird durch die Aktivität von CYTOKININ OXYDASE/DEHYDROGENASE (CKX) Enzymen abgebaut und die Reduktion von CKX3 und CKX5 führt zu einer Vergrößerung des Meristems mit breiterer *WUS*-Expression (Bartrina et al., 2011). Den gegenteiligen Effekt erhält man, wenn die Aktivität von *LONELY GUY (LOG)* Cytokinin-Ribosid-5'-Monophosphat Phosphoribohydrolasen reduziert wird (Kurakawa et al., 2007, Kuroha et al., 2009). Sie sind für die Biosynthese von Cytokinin verantwortlich. Interessanterweise wird *LOG4* spezifisch in der L1 des SAM exprimiert und könnte somit einen apikal-basalen Cytokinin-Gradienten erzeugen, der die einzelnen Domänen des SAM spezifiziert (Chickarmane et al., 2012). Ein weiteres Signal, das spezifisch von der L1 aus sekretiert wird, ist die miR394, die *LEAF*

*CURLING RESPONSIVENESS (LCR)* negativ reguliert und dadurch die Stammzellidentität in der CZ erhält (Knauer et al., 2013). Daneben gibt es einen Gradienten von AHP6-Protein, das als negativer Regulator im Cytokinin-Signalweg fungiert, ausgehend von neu initiierten Primoriden am Rand in Richtung Zentrum des SAM. Hierdurch wird die Cytokinin-Signaltransduktion auf das Zentrum beschränkt und die zeitliche und räumliche Organisation der Organneubildungen stabilisiert (Besnard et al., 2014).

Die räumliche Anordnung der nacheinander gebildeten Organe wird als Phyllotaxis bezeichnet. Sie wird in erster Linie durch ein weiteres Pflanzenhormon, das Auxin, reguliert (Reinhardt et al., 2000). Das physiologisch wichtigste Auxin ist Indol-3-Essigsäure (IAA), von dem aber verschiedene natürliche und synthetische Derivate, wie 1-Naphthylessigsäure (NAA) und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), existieren (Michniewicz et al., 2007). Auxin ist für nahezu jeden Aspekt des pflanzlichen Wachstums und der Entwicklung von Bedeutung (Zhao, 2010). Es markiert Entwicklungsdomänen durch lokal unterschiedliche Konzentrationen, die durch polaren Auxin-Transport mit Hilfe der PIN-FORMED (PIN) Efflux-Proteine erzeugt werden (Petrásek und Friml, 2009). In der Peripherie des SAM verstärkt der durch PIN1 erzeugte Auxin-Flux die polare Lokalisation und Expression dieses Efflux-Proteins und stabilisiert so das Auxin-Muster mit hoher Konzentration in den sich neu bildenden Primordien und niedriger Konzentration im Zentrum (Reinhardt et al., 2000; Heisler et al., 2005; Jönsson et al., 2006). Auxin wird durch die TIR1/AFB1-5 Untereinheit eines E3-Ubiquitinligase-Komplexes gebunden und löst die Proteolyse von Repressoren der AUX/IAA-Familie durch das Proteasom aus. Dadurch wird die physische Inhibition von Transkriptionsfaktoren der AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) Familie aufgehoben, und die primäre transkriptionelle Antwort erfolgt (Dharmasiri et al., 2005; Chapman und Estelle, 2009). Die einzelnen Komponenten der Auxin-Signaltransduktion sind im SAM jedoch unterschiedlich exprimiert, was zu einer unterschiedlichen Sensitivität gegenüber Auxin führt. Während die CZ nur wenig sensitiv gegenüber Auxin ist, zeichnet sich die PZ durch hohe Sensitivität aus (Vernoux et al., 2011). Von den insgesamt 23 ARFs scheinen die meisten Repressoren zu sein, nur ARF5,6,7,8 und 19 sind Aktivatoren (Guilfoyle und Hagen, 2007). Von besonderer Bedeutung während der Embryogenese ist ARF5/MONOPTEROS (MP), das wichtig für Zellspezifizierung ist, und durch das AUX/IAA BODENLOS (BDL) komplexiert und in seiner Funktion reprimiert wird (Weijers et al., 2006; Hamann et al., 2002). In der Peripherie des SAM ist MP nicht nur Effektor der Auxin-Signaltransduktion, sondern aktiviert direkt die Expression von *AHP6* und beschränkt so die Cytokinin-Antwort auf das Zentrum des SAM (Besnard et al., 2014). Interessanter Weise unterstützt MP zusätzlich die Cytokinin-Sensitivität des Zentrums, indem es dort direkt die Typ-A *ARRs* 7 und 15 reprimiert (Zhao et al., 2010). Während des Übergangs in die reproduktive Phase aktiviert MP direkt die Expression von *LEAFY (LFY)*, *AINTEGUMENTA (ANT)* und *AINTEGUMENTA-LIKE6 (AIL6)*, die notwendig sind für Blütenidentität und Blütenauswuchs (Yamaguchi et al., 2013; Weigel et al., 1992; Elliott et al., 1996). LFY wiederum aktiviert die Auxin-

Signaltransduktion, was zu einer Verstärkung und Stabilisierung des Blütenprogramms führt (Yamaguchi et al., 2013).

Neben der Interaktion mit dem Auxin-Signalweg, stabilisiert LFY das Blühprogramm auch über die Regulation des Gibberellin-Signaltransduktionswegs (Yamaguchi et al., 2014). Über die Aktivierung der Expression des Gibberellinsäure (GA) katabolisierenden Enzyms *EUI-LIKE P450 A1 (ELA1)* reduziert es die Menge an GA in den sich entwickelnden Primordien. Bei GA handelt es sich um eine Gruppe von Diterpenen die als Phytohormone wirken (Sun, 2008). GA wird durch den cytosolischen Rezeptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1) gebunden (Ueguchi-Tanaka et al., 2005). In *Arabidopsis* sind dies drei Gene (*GID1A*, *GID1B*, *GID1C*) (Nakajima et al., 2006). Durch die Bindung von GA ist GID1 in der Lage mit Repressoren der DELLA-Familie zu interagieren. Diese werden daraufhin, analog zur Auxin-Signaltransduktion, von einer E3-Ubiquitinligase mit der F-Box Untereinheit SLEEPY1 (SLY1, in Mais GID2) zur Degradierung durch das Proteasom markiert (Davière und Achard, 2013). Die DELLA-Proteine, von denen die wichtigsten GA INSENSITIVE (GAI) und REPRESSOR OF GA (RGA) sind, können so die Aktivität von verschiedenen Transkriptionsfaktoren nicht mehr inhibieren (Davière und Achard, 2013). Zusätzlich rekrutieren SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Proteine RGA zum Promoter des Blütenidentitätsgens *APELATA1 (API)* und aktivieren so dessen Expression (Yamaguchi et al., 2014). Hierdurch wird die Blütenidentität stabilisiert.

Wie gezeigt wurde, sind unterschiedliche Hormon-Signale im SAM wichtig, um Domänen und Entwicklungszustände zu definieren. Außerdem wird die vorzeitige Differenzierung der Zellen des SAM durch die Aktivität von STM sichergestellt, das dadurch die Expression von Differenzierungsfaktoren auf die sich entwickelnden Organe beschränkt. Von zentraler Bedeutung für den Erhalt einer Stammzellpopulation ist jedoch WUS, dem der nächste Abschnitt gewidmet ist.

## **I.5 Der Transkriptionsfaktor WUSCHEL**

Die Expression von *WUS* kann schon sehr früh während der Embryogenese nachgewiesen werden. Im 16-Zell Stadium werden bereits die inneren vier Zellen des apikalen Teils des Embryos durch *WUS* markiert (Mayer et al., 1998). Damit erfolgt die *WUS*-Expression deutlich früher als die des Stammzellmarkers *CLV3* (Fletcher et al., 1999). Im Laufe der Entwicklung wird die *WUS*-Expressionsdomäne definiert und bildet später das beschriebene OC. Dort bleibt die Expression bis in die reproduktive Phase erhalten, bis sie durch die Aktivität des homöotischen Blütentranskriptionsfaktors *AGAMOUS (AG)* reprimiert wird, was zur Terminierung des Meristems führt (Lenhard et al., 2001). Die Expression von *AG* wurde davor jedoch direkt durch ein Zusammenspiel von *WUS* und *LFY* aktiviert (Lohmann et al., 2001). *WUS* terminiert somit indirekt seine eigene Expression. Außerdem spielt *WUS* eine wichtige Rolle bei der Zelltyp Spezifizierung während der Antherenentwicklung (Deyhle et al., 2007).

Der Name WUSCHEL geht auf den Mutantenphänotyp zurück. Alte Pflanzen wirken wie kleine wuschelige Büsche mit einer willkürlichen Abfolge von Blattrosetten und Stängeln, die wieder Blattrosetten bilden. Diese Mutanten bringen nur selten Blüten hervor. Wenn doch sind die Reproduktionsorgane auf nur eine Anthere von sonst sechs reduziert und Fruchtblätter fehlen völlig (Laux et al., 1996). Dieser Phänotyp entsteht durch den Verlust der Primären Stammzellpopulation im SAM, deutlich erkennbar in jungen Keimlingen denen diese Struktur komplett fehlt (Leibfried et al., 2005). In der *wus*-Mutante kann die Stammzellidentität nicht erhalten werden, und die Zellen der CZ werden während der Bildung einzelner Organe verbraucht (Mayer et al., 1998). Die kurzzeitige Aktivität von sekundären Stammzellpopulationen, die auch wieder verbraucht werden, führt über lange Zeit zur Ausprägung des Phänotyps. *WUS* ist aber nicht nur für den Erhalt der Stammzellpopulation des SAM notwendig, seine Funktion ist auch ausreichend, um in kompetenten Geweben diese Stammzellidentität zu induzieren. Bei gleichzeitiger ektopischer Expression von *WUS* und *STM* in differenziertem Gewebe kann dort die Organogenese neu induziert werden (Gallois et al., 2002). Die beiden Transkriptionsfaktoren übernehmen dabei unabhängige Aufgaben, bewirken aber synergistisch die De-Differenzierung von Zellen in Stammzellen (Lenhard et al., 2002). Bei konstitutiver, ektopischer Expression von *WUS* alleine bilden sich neue Sprossachsen aus differenziertem Gewebe des Stängels, zusätzliche Blütenstrukturen in Infloreszenzmeristemen, vegetative Embryonen und Sprossachsen auf der Blattspreite und sogar grüne, blattartige Strukturen des Sprosses in der Wurzel (Xu et al., 2005; Gallois et al., 2004). *WUS* kann also in dafür empfänglichem Gewebe eigenständig spezifisch Stammzellsysteme des Sprosses induzieren.

*WUS* ist ein Transkriptionsfaktor, der über seine Homöodomäne (HD) sequenzspezifisch DNA bindet (Busch et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass *WUS* sowohl ein G-Box genanntes Sequenzmotiv (CACGTG), als auch ein TTAAT[C/G][C/G] Motiv binden kann (Busch et al., 2010; Lohmann et al., 2001). Im Kontext der Stammzellregulation wirkt *WUS* größtenteils als Repressor, während der Musterbildung in der Blüte aktiviert es jedoch sein direktes Zielgen *AG* (Busch et al., 2010; Ikeda et al., 2009; Yadav et al., 2013; Lohmann et al., 2001). Diese bivalente Funktion wird *WUS* durch unterschiedliche Protein-Domänen ermöglicht. Neben der HD für die sequenzspezifische Interaktion mit DNA, gibt es die sogenannte *WUS*-Box, die für die Funktion als Repressor unerlässlich ist, eine ERF-ASSOCIATED AMPHIPHILIC REPRESSION (EAR)-like Domäne, die unterstützend wirkt und einen Bereich mit sauren Aminosäuren, der als Transaktivationsdomäne wirkt (Kieffer et al., 2006; Ikeda et al., 2009). Der Rest des Proteins scheint unstrukturiert zu sein (van der Graaff et al., 2009).

Das *WUS*-Protein gelangt auf symplastischem Weg durch Plasmodesmata vom Ort seiner Expression in die darüberliegenden Stammzellen und ist dort für deren Identität notwendig. Ermöglicht wird diese Translokation durch die HD, sie wird jedoch durch Bereiche im unstrukturierten Teil des Proteins eingeschränkt (Daum et al., 2014). Über den C-terminalen Bereich, in dem auch die Transaktivationsdomäne, die *WUS*-Box und die EAR-Domäne liegen, kann *WUS* homodimerisieren (Busch et al.,

2010). Über diesen Bereich, insbesondere über die WUS-Box, kann WUS mit Gro/Tup1 Co-Repressoren der TOPLESS (TPL/TPR)-Familie interagieren (Causier et al., 2012; Kieffer et al., 2006). Diese interagieren mit der HISTONE DEACETYLASE 19 (HDA19), die die Deacetylierung von Histonen katalysiert und dadurch die Expression von Zielgenen inhibiert (Zhang et al., 2014; Pi et al., 2015). Es liegt nahe, dass WUS auf diese Weise seine repressive Funktion ausübt (Kieffer et al., 2006). Weitere wichtige Interaktoren sind die HAIRY MERISTEM (HAM1-4) Transkriptionsfaktoren. Deren Interaktion mit WUS über einen Bereich unmittelbar vor der Transaktivationsdomäne für die Funktion von WUS wichtig ist (Zhou et al., 2015). Sowohl die TPL/TPR als auch die HAM Proteine interagieren neben WUS auch mit einer Reihe weiterer Proteine der WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN (WOX)-Familie (Zhang et al., 2014; Pi et al., 2015; Zhou et al., 2015).

Als Transkriptionsfaktor reguliert WUS die Expression von Zielgenen durch Bindung an spezifische Elemente in deren Promoter. Diese Zielgene sind die primäre Antwort auf den WUS-Stimulus und können weitere, sekundäre Antworten nach sich ziehen. Für einzelne Gene konnte bereits nachgewiesen werden, dass ihr Promoter durch WUS gebunden und ihre Expression im SAM durch WUS reguliert wird. Wie bereits erwähnt, aktiviert WUS direkt die Expression von *AG* in der Blüte und definiert dadurch die inneren Wirtel mit den reproduktiven Organen (Lohmann et al., 2001). Diese direkte Aktivierung erfolgt in Kooperation mit LFY und erfordert eine funktionelle Transaktivationsdomäne. Dabei sind die WUS-Box und die EAR-Domäne unwichtig (Lohmann et al., 2001; Ikeda et al., 2009). Als Teil der Musterbildung in der Blütenentwicklung ist diese Regulation jedoch unabhängig von der WUS-Funktion während der Stammzellregulation. Diese wird teilweise über die direkte Repression von *ARR7*, und wahrscheinlich weiterer Typ-A *ARRs*, ausgeübt, da hierdurch das Cytokinin-Signal im Zentrum des SAM verstärkt wird. Die Überexpression von aktiviertem *ARR7* (Aspartat 85 zu Glutamat) führt zu gravierenden Defekten bis hin zum vollständigen Meristemverlust (Leibfried et al., 2005). Diese Funktion wird mit Hilfe der WUS-Box erfüllt (Ikeda et al., 2009). Außerdem stabilisiert WUS seine eigene Expression über die direkte Repression seines Repressors *CLV1* (Busch et al., 2010). Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass WUS in den Stammzellen direkt die Expression von *CLV3* aktiviert und somit indirekt seine eigene Expression reprimiert (Yadav et al., 2011). Zusätzlich reprimiert WUS direkt die Differenzierungsfaktoren *KANADII* (*KANI*) und 2 sowie *AS2* und *YABBY3* (*YAB3*) und erhält hierdurch mutmaßlich den undifferenzierten Zustand der Stammzellen aufrecht (Yadav et al., 2013). Interessanterweise werden die Co-Repressoren *TPL*, *TPR1* und *TPR2* direkt durch WUS in ihrer Expression aktiviert (Busch et al., 2010). Da diese Proteine Teil eines WUS-abhängigen Repressionskomplexes sein könnten, würde WUS so sicherstellen, dass alle Komponenten für die Genregulation ausreichend vorhanden sind (Kieffer et al., 2006).

WUS ist namensgebend für die Gruppe der WOX Transkriptionsfaktoren, bestehend aus fünfzehn Proteinen in *Arabidopsis*, gruppiert in drei evolutionäre Kladen (Haecker et al., 2004; van der Graaff et al., 2009). Die alte Klade mit *WOX10*, *13* und *14* beinhaltet die ursprünglichen Versionen der

WOX-Proteine, wie sie bereits bei Grünalgen und dem Moos *Physcomitrella patens* vorkommen. Die WOX-Proteine der mittleren Klade (WOX8, 9, 11 und 12) kommen bereits bei Gefäßpflanzen vor. WOX1-7, die zusammen mit WUS die moderne Klade bilden, findet man hingegen erst bei den Samenpflanzen (van der Graaff et al., 2009). Während alle WOX-Proteine eine DNA-bindende HD besitzen, enthalten nur die Transkriptionsfaktoren der modernen Klade eine WUS-Box und EAR-Domäne (van der Graaff et al., 2009).

Viele dieser Faktoren konnten mit wichtigen Funktionen während des Wachstum und der Entwicklung der Pflanze in Verbindung gebracht werden. So spielen WOX2,8 und später 9 wichtige Rollen während der anfänglichen Musterbildung im Embryo. WOX2 markiert den apikalen, WOX9 den mittleren und WOX8 den basalen Teil des Embryos (Breuninger et al., 2008). Dabei wirken Cytokinin-Signale über WOX9 und erhalten die Zellteilung im Embryo aufrecht (Skylar et al., 2010; Wu et al., 2007). Im SAM wirkt WOX9 synergistisch mit WUS und integriert Signale über den Energieversorgungszustand der Pflanze (Wu et al., 2005). Während der Blattentwicklung spielen WOX3 und WOX1 eine wichtige Rolle beim Auswachsen der Blattspreite und der Entwicklung des Blattrandes (Nakata et al., 2012). Die Entwicklung der Vaskulatur wird durch WOX4 und WOX14 reguliert (Etchells et al., 2013). Dabei ist WOX4 durch Auxin-Signale verantwortlich für die Regulation des Kambiums (Suer et al., 2011; Ji et al., 2010). In der Wurzel wird die Stammzell-organisierende Domäne, das Ruhende Zentrum (QC), durch WOX5 definiert. Analog zu WUS im SAM erhält WOX5 die Stammzellen der Wurzel (Sarkar et al., 2007). WOX5 ist auch verantwortlich für den Erhalt des Ruhezustands der Zellen des QC, indem es direkt die CYCLIN D (CYCD) Aktivität, und damit den Zellzyklus, reprimiert (Sarkar et al., 2007). Wie WUS wandert es als Protein in angrenzende Stammzellen und reguliert dort deren Identität durch die Repression von Zielgenen mit Hilfe eines Repressionskomplexes aus TPL/TPR und HDA19 (Pi et al., 2015). Für die Ausbildung von neuen Wurzeln nach Verwundung ist die Aktivität von WOX11 und 12 notwendig, um als einer der ersten Schritte eine Reprogrammierung der Zellidentität zu ermöglichen (Liu et al., 2014a). Auch während der reproduktiven Entwicklung spielen WOX-Gene eine wichtige Rolle. So wird die Entwicklung des Replums in der Frucht durch WOX13 gefördert, während WOX6 wichtig ist für die Regulation der Samenanlagenentwicklung (Romera-Branchat et al., 2013; Park et al., 2005).

Das hohe evolutionäre Alter der WOX-Familie und die Vielzahl der durch sie regulierten Entwicklungsprogramme unterstreicht nicht nur die Bedeutung dieser Transkriptionsfaktoren für Pflanzenwachstum und Entwicklung, sondern legt auch ähnliche Wirkmechanismen, zumindest innerhalb der modernen Klade (WOX1-7 und WUS), nahe. So überrascht es nicht, dass alle Gene der modernen WOX-Klade, mit Ausnahme von WOX7, das keine WUS-Box besitzt, den „*bladeless*“ Blattphänotyp in *Nicotiana sylvestris* bei Verlust der LAMI (ein WOX der modernen Klade) Aktivität funktionell ersetzen können (Lin et al., 2013). Auch im Rahmen der Stammzellkontrolle in *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass sich WUS und WOX5 in der jeweils anderen Domäne funktionell ersetzen können

(Sarkar et al., 2007). Dies legt einen allgemeinen Regulationsmechanismus der Stammzellen nahe, der auch in sekundären Meristemen, wie dem Kambium, vorliegen könnte.

## I.6 Epigenetische Regulation des SAM

In einem sich ständig durch Zellteilung verändernden SAM müssen die unterschiedlichen Gradienten an Hormon- und Proteinsignalen in robuste Expressionsmuster übersetzt werden. Epigenetische Regulation spielt hierbei eine entscheidende Rolle (Lodha et al., 2009). Deutlich wird dies beim Verlust der Aktivität des POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX2 (PRC2), der zu einer Überproliferation von undifferenzierten Zellen im SAM führt (Schubert et al., 2005). Dieser Komplex ist sowohl in Pflanzen als auch Tieren konserviert und katalysiert die Methylierung von Lysin 27 und 9 in Histon 3 (H3K27 und H3K9) des Nukleosoms. Hierdurch wird der ebenfalls konservierte PRC1 Komplex rekrutiert, der das Chromatin stabil komprimiert und dadurch unzugänglich für Transkriptionsfaktoren macht (Margueron und Reinberg, 2011). Diese Form der stabilen Repression erfolgt z.B. jenseits der Meristemgrenze in den Primordien, wo ein Dimer aus AS1 und 2 den PRC2 Komplex zum Promoter von *KNAT2* und *BP* rekrutiert und diese Gene inaktiviert (Guo et al., 2008; Lodha et al., 2013). Aber auch im Zentrum ist die Funktion wichtig, da der teilweise Verlust der PRC2 Aktivität in der *curly leay (clf)* Mutante zu einer deutlichen Steigerung der *WUS*-Expression führt (Barrero et al., 2007). Darüber hinaus sind weitere epigenetische Modifikatoren des *WUS*-Promoters bekannt. Die SWI/SNF-Klasse ATPase SPLAYED (SYD) bindet direkt im Promoter von *WUS* und ist notwendig für dessen Expression (Kwon et al., 2005). Auch BREAST CANCER ASSOCIATED RING1 (BARD1) interagiert mit dem *WUS*-Promoter und limitiert die Expressionsdomäne auf das Zentrum des SAM (Han et al., 2008). Ebenso bindet die TOPOISOMERASE 1 $\alpha$  (TOP1 $\alpha$ ) den *WUS*-Promoter und ermöglicht, über die Modifikation der Nukleosomen-Dichte, die epigenetische Repression durch den PRC2-Komplex (Liu et al., 2014b). Auch andere Faktoren wirken über die Verteilung der Nukleosomen im Chromatin. Beim Aktivitätsverlust des CHROMATIN ASSEMBLY FACTOR1 (CAF1) Komplexes durch Mutation der Untereinheiten *fasciata 1 (fas1)* und 2 kommt es zu einer Ausdehnung der *WUS*-Expressionsdomäne (Kaya et al., 2001). Der CAF1 Komplex ist verantwortlich für den Zusammenbau von Nukleosomen an der Replikationsgabel und beeinflusst damit die Positionierung und Dichte der Nukleosomen im Chromatin (Gaillochet und Lohmann, 2015).

Eine weitere Form der epigenetischen Regulation könnte durch *WUS* selbst erfolgen. Wie erwähnt interagiert *WUS* mit der TPL/TPR-Familie an Gro/Tup1 Co-Repressoren (Kieffer et al., 2006). Wahrscheinlich kann auch *WUS*, wie *WOX5*, mit Hilfe dieser Faktoren HDA19 rekrutieren und Zielgene reprimieren (Pi et al., 2015). Histon Deacetylasen (HDAC) katalysieren die Abspaltung von Acetylgruppen von modifizierten Lysinen in Histon 3 (H3Kac), was, durch die Entfernung gleicher Ladungen, die Abstoßungskräfte zwischen den einzelnen Nukleosomen verringert und eine Komprimierung des Chromatins erlaubt (Hollender und Liu, 2008). Daher werden HDACs und ihre Effekte gemeinhin mit Repression von Genexpression in Verbindung gebracht (Wang et al., 2009).



Unterbindet man die HDAC Funktion pharmakologisch durch die Behandlung mit Trichostatin A, so führt dies zu einer Termination des SAM (Chang und Pikaard, 2005; Kieffer et al., 2006). Auch wenn Histon Deacetylierung wahrscheinlich ein allgemeiner Prozess in der Genregulation ist, so macht es doch deutlich, welche Bedeutung diese transiente epigenetische Repression auf die Regulation der Pflanzenentwicklung hat.

## **I.7 Zusammenfassung und Ziel der Arbeit**

Pflanzen sind für das Leben auf der Erde von essentieller Bedeutung. Sie sind verantwortlich für die Zusammensetzung unserer Atmosphäre und als Primärproduzenten Grundlage für die Welternährung. Der größte Teil der dafür zuständigen Strukturen, nämlich alle oberirdischen Teile der Pflanzen, werden postembryonal durch die kontinuierliche Aktivität einer Stammzellpopulation am Scheitelpunkt der Sprossachse gebildet. Die Stammzellen erhalten ihre Identität durch ihre Lage in einer Nische, dem apikalen Sprossmeristem (SAM). Diese winzige Struktur enthält neben den undifferenzierten Stammzellen auch ein Reservoir an sich häufig teilenden Zellen, die durch Zellteilung und Wachstum immer weiter in Richtung Peripherie verdrängt werden und dort in sich neu bildende Organe aufgenommen werden. Durch seine Lage ist das SAM äußerst robust gegen Umwelteinflüsse und Verletzung. Seine einzelnen Bereiche werden durch eine Vielzahl mobiler molekularer Signale spezifiziert und erhalten, die schließlich in stabile Expressionsmuster übersetzt werden. Als zentraler Mechanismus zur Regulation der Stammzellpopulation dient eine molekulare Rückkopplungsschleife zwischen dem direkt Stammzellidentität erhaltenden Transkriptionsfaktor WUSCHEL (WUS) und dem von den Stammzellen sekretierten Peptid CLAVATA3, das die Expression von WUS reprimiert. Die WUS-Aktivität ist notwendig und ausreichend, um die Stammzellidentität zu spezifizieren. Da es sich um einen Transkriptionsfaktor handelt, darf man davon ausgehen, dass ein Großteil dieser Aktivität auf der direkten Regulation von transkriptionellen Netzwerken beruht. Einzelne Interaktionen sind bereits bekannt und geben Hinweise auf die Funktion von WUS. Für ein wirkliches Verständnis der WUS-Funktion wird jedoch ein globales Bild der WUS-Interaktionen mit dem Netzwerk benötigt.

Aufgabe dieser Arbeit ist es daher die WUS-Funktion möglichst umfassend abzubilden. Dies beinhaltet einerseits die Identifikation der durch WUS regulierten Prozesse durch die Charakterisierung der direkten WUS-Zielgene und andererseits die Analyse der molekularen Grundlagen dieser Regulation. Im Detail bedeutete das für diese Arbeit:

- 1) Etablierung eines Testsystems für die WUS-Funktion
- 2) Charakterisierung des molekularen Effekts von WUS auf seine Zielgene
- 3) Charakterisierung der durch WUS regulierten molekularen Prozesse auf Grund der Zielgene
- 4) Vergleich des WUS-Effekts mit dem anderer Transkriptionsfaktoren

Diese Arbeit versteht sich, durch die Beschreibung der globalen WUS-Funktion, als Grundlage und Ausgangspunkt für die eingehendere Analyse spezifischer Einzelprozesse und Genregulationen während der Regulation der Stammzellidentität in *Arabidopsis thaliana*.

## II. MATERIAL

Sämtliche Arbeiten erfolgten in den Räumlichkeiten und mit der Ausstattung der Abteilung Stammzellbiologie (Prof. Jan Lohmann) des Centre for Organismal Studies (COS) Heidelberg an der Universität Heidelberg.

### II.1 Organismen

#### II.1.1 Pflanzen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Pflanzen waren *Arabidopsis thaliana* des Ökotyps Col-0. Neben dem Wildtyp wurde mit folgenden abgeleiteten Linien gearbeitet:

**Tabelle 1: In der Arbeit verwendete Pflanzenlinien**

Bezeichnung	Konstrukt	Bezugsquelle
DRE33	p35S::H2B-3xYFP-NLS	eigene Linie
DRE34	pML1::H2B-3xYFP-NLS	eigene Linie
DRE35	pCLV3::H2B-3xYFP-NLS	eigene Linie
DRE36	pWUS::H2B-3xYFP-NLS	eigene Linie
WUS-GR (JF359-14)	pUBI10::mCherry-GR-WUS	Utan, 2012
bpc1,2,3	bpc1-2,2,3	Simonini und Karter, 2014
DR5v2-GFP	DR5v2::ntdTomato + DR5::n3GFP	Liao et al., 2015
TCS-GFP	TCS::GFP	Zürcher et al., 2013
RGA-GFP	pRGA::RGA-GFP	Silverstone et al., 2001
WUS-GR x DR5v2-GFP	pUBI10::mCherry-GR-WUS x DR5v2	eigene Kreuzung
WUS-GR x TCS-GFP	pUBI10::mCherry-GR-WUS x TCS	eigene Kreuzung
WUS-GR x RGA-GFP	pUBI10::mCherry-GR-WUS x pRGA::RGA-GFP	eigene Kreuzung
GD103	pCLV3::WUS-GFP	Daum, 2014
GD155	pCLV3::WUS $\Delta$ box-GFP	Daum, 2014
DRE46	pCLV3::WUS $\Delta$ box-HDA19	eigene Linie
MG84	pAP3::WUS-GFP	Dr. Michael Gebert
DRE48	pAP3::WUS $\Delta$ box-GFP	eigene Linie
DRE49	pAP3::WUS $\Delta$ box-HDA19	eigene Linie

### II.1.2 Nematoden

Bei den für die Pflanzenvorbereitung verwendeten Nematoden handelte es sich um *Steinernema feltiae*, bezogen von E-Nema GmbH (Schwentinental, Deutschland).

### II.1.3 Bakterienstämme

Stämme für Klonierungsarbeiten

*Escherichia coli*: DH5α (Clontech; Mountain View, USA)  
(F-  $\phi$ 80d*lacZ*  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* (rk-, m k+) *phoA supE44*  $\lambda$ -*thi-1 gyrA96 relA1/F'* *proAB+ lacIqZ*  $\Delta$ M15 Tn10 (*tetr*))

*Escherichia coli*: XL1MR: (Stratagene; La Jolla, USA)  
 $\Delta$ (*mcrA*)183 $\Delta$ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac*

Stämme zur Pflanzen Transformation

*Agrobacterium tumefaciens*: ASE: KanR, CamR, pSoup+ (TetR); (Fraley et al., 1985)

## II.2 Vektoren

### II.2.1 Standardvektoren

pDONR221 (Life technologies; Carlsbad, USA)  
pENTR1A (Life technologies; Carlsbad, USA)  
pGREENIIS vector series (Markus Schmid, Jan Lohmann, Detlef Weigel)  
pGEM®-T Easy (Promega; Mannheim, Deutschland)

### II.2.2 Konstrukte

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Konstrukte wurden mit annotierter Vektorkarte und Sequenz in der Labor-eigenen Filemaker Datenbank der Abteilung Stammzellbiologie hinterlegt.

## II.3 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammten, mit folgenden Ausnahmen, von den Firmen Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) und Merck (Darmstadt, Deutschland).

Phyto Agar	(Duchefa; Haarlem, Niederlande)
Protein A-Agarose	(Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA)
Silwet L-77	(Lehle Seeds; Texas, USA)
Farbstoff	
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	(Roth; Karlsruhe, Deutschland)

DAPI wurde mit 10mg/ml in Wasser eingesetzt.

### II.3.1 Antibiotika und Herbizide

Antibiotika-Lösungen wurden als 1000x Stammlösungen angesetzt.

100mg/ml Ampicilin	(Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
25mg/ml Chloramphenicol in EtOH	(Roth; Karlsruhe, Deutschland)
50mg/ml Kanamycin	(Roth; Karlsruhe, Deutschland)
100mg/ml Spectinomycin	(Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
10mg/ml Tetracyclin in EtOH	(Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
7,5mg/ml Sulfadiazin	(Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)

Zur Pflanzenselektion wurde das Glufonizat BASTA (Bayer; Leverkusen, Deutschland) verwendet.

### II.3.2 Antikörper

Anti-WUSCHEL (polyklonal, Kaninchen)	(Leibfried et al., 2005; Busch et al., 2010)
Anti-BPC (polyklonal, Kaninchen)	(Simonini et al., 2012)
Anti-H3ac (06-599)	Merck Millipore; Billerica, USA
Anti-H3K27me3 (07-449)	Merck Millipore; Billerica, USA
Anti-mCherry RFP-Trap_A (rta-100)	Chromotek; Martinsried, Deutschland

### II.3.3 Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme stammten, mit folgenden Ausnahmen, von Thermo Scientific (Waltham, USA) oder New England Biolabs (Ipswich, USA).

Proteinase K (recombinant, PCR grade)	(Roche; Basel, Schweiz)
Phusion® DNA Polymerase	(Finnzymes; Espoo, Finnland)

### II.3.4 Nukleotide/Nukleinsäuren

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Eine Liste befindet sich im Anhang.

Der DNA Größenstandard Gene Ruler DNA Ladder Mix wurde ebenso wie der dNTP Mix von Thermo Scientific (Waltham, USA) bezogen.

## II.4 Kits

Im Folgenden sind die verwendeten Kits aufgelistet. Sie wurden entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt.

innuPREP DOUBLEpure Kit	(Analytik Jena; Jena, Deutschland)
innuPREP Plasmid Mini Kit	(Analytik Jena; Jena, Deutschland)
MinElute Reaction Cleanup Kit	(Qiagen; Venlo, Niederlande)
RNeasy Plant Mini Kit	(Qiagen; Venlo, Niederlande)
GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit	(Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	(ThermoScientific; Waltham, USA)
RNAMaxx High Yield Transcription Kit	(Agilent; Santa Clara, USA)
SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix	(Life Technologies; Carlsbad, USA)

## **II.5 Medien**

### **II.5.1 Medien zur Pflanzenzucht**

Agarplatten mit 0,5x MS Pflanzenmedium (Murashige und Skoog, 1962):

2,15g/l MS-Salze  
8g/l Phyto Agar (0,8 %)  
pH 5,8 mit KOH

Das Medium wurde in der Mikrowelle aufgekocht und vollständig gelöst. Danach wurde es herab gekühlt und unter der Sterilbank in Petrischalen gegossen und ausgehärtet. Für Selektionen wurde dem etwa 60°C heißem Medium 1ml/l Antibiotikum-Stammlösung zugegeben.

### **II.5.2 Medien zur Bakterienzucht**

Die Flüssig- und Festmedien wurden von den Mitarbeitern der zentralen Spülküche hergestellt. Die Zugabe von Antibiotika zu je 1ml/l Stammlösung (s.o.) erfolgte nach dem Autoklavieren entweder in das abgekühlte Flüssigmedium, oder in das noch flüssige Festmedium, bevor es in Petrischalen gegossen wurde und aushärten konnte.

LB-Medium

5g/l Hefeextrakt  
10g/l Trypton  
5g/l NaCl  
10g/l Agar (nur für Festmedium)  
je 1ml/l Antibiotikum-Stammlösung (optional)

### **II.5.3 Puffer und Lösungen**

Sämtliche Puffer und Lösungen wurden mit Millipore-gefiltertem Wasser angesetzt und autoklaviert, bzw. steril-gefiltert.

#### ***II.5.3.1 Allgemeine Puffer und Lösungen***

Standard-Puffer und Lösungen wurden nach den Protokollen von Sambrook et al., (2001) hergestellt.

#### ***II.5.3.2 Pflanzen-Transformation***

Transformationspuffer

5% Saccharose (frisch angesetzt)  
0,05% Silwet L-70 (frisch zugeben)

#### ***II.5.3.3 Sterilisation von Pflanzensamen***

Bleiche

0,6 % Natriumhypochlorid  
1 % Triton X-100

### ***II.5.3.4 Lösungen zur Behandlung von Pflanzen mit Chemikalien***

#### Stammlösungen

Dexamethason (DEX)	5mM in Ethanol
Cycloheximid (Cyclo)	10mM in DMSO
Trichostation A (TSA)	10mM in Wasser
1-N-Naphthylphthalaminsäure (NAA)	100mM in DMSO
1-Naphthylelessigsäure (NPA)	100mM in DMSO

Für die Behandlungen wurden folgende Konzentrationen eingesetzt: 25µM Dexamethason, 10µM Cycloheximid, 1µM Trichostation A, 50µM bzw. 250µM 1-N-Naphthylphthalaminsäure und 20µM 1-Naphthylelessigsäure. Die Behandlung erfolgte jeweils in ½ MS Medium mit 0,015% Silwet L-70. Die Chemikalien wurden einzeln, oder in Kombination eingesetzt. Die Kontrolllösungen entsprachen jeweils den Behandlungslösungen, enthielten aber an Stelle einer der Chemikalien nur das gleiche Volumen an entsprechendem Lösungsmittel.

### ***II.5.3.5 Chromatin-Immunoprecipitation***

#### Induktionslösungen

##### Induktionslösung

25µM Dexamethason in 0,5x MS mit 0,015% Silwet L-70

##### Kontrolllösung

5µl/ml Ethanol in 0,5x MS mit 0,015% Silwet L-70

#### Lösungen für die Gewebefixierung

##### Fixierlösung

10mM Natriumphosphat, pH 7,0  
50mM NaCl  
100mM Saccharose  
0,33% Formaldehyd (Methanol-frei)

#### Lösungen zur Zellkernisolation

##### Kernpräparationspuffer

20mM MOPS, pH 7,0  
40mM NaCl  
90mM KCl  
45mM MgCl<sub>2</sub>  
2mM EDTA  
0,5mM EGTA  
0,5mM Spermidin (frisch zugegeben)  
0,2mM Spermin (frisch zugegeben)  
1x Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablette (Roche; Basel, Schweiz)

## Lösungen für die Chromatin-Immunopräzipitation

### Sonifizierungspuffer

10mM Natriumphosphat, pH 7,0  
0,1M NaCl  
0,5% Sarkosyl  
10mM EDTA  
1x Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablette (Roche; Basel, Schweiz)  
1mM Pefabloc SC-Protease-Inhibitor (Roche; Basel, Schweiz)

### ChIP Verdünnungspuffer

16,7mM Tris/HCl, pH 8,0  
167mM NaCl  
1,2mM EDTA  
1,1% Triton X-100

### Niedrigsalz Waschpuffer

20mM Tris/HCl, pH 8,0  
150mM NaCl  
0,1% SDS  
1% Triton X-100  
2mM EDTA

### Hochsalz Waschpuffer

20mM Tris/HCl, pH 8,0  
500mM NaCl  
0,1% SDS  
1 % Triton X-100  
2mM EDTA

### LiCl Puffer

10mM Tris/HCl, pH 8,0  
0,25M LiCl  
1 % Igepal CA630  
1 % Na-Desoxycholat  
1mM EDTA

### TE-Puffer

10mM Tris/HCl, pH 8,0  
1mM EDTA

### Elutionspuffer

0,1M Natriumhydrogenkarbonat (frisch angesetzt)  
1% SDS



## II.6 Geräte

Die folgende Liste umfasst die in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Digitale Kamera AxioCam HRC	(Carl Zeiss; Oberkochen, Deutschland)
Digitalkamera Nikon Digital D60	(Nikon Corporation; Tokyo, Japan)
DNA Engine/Chromo4 TM RT Detector	(Bio-Rad; Hercules, USA)
Dyad DNA Engine	( Bio-Rad; Hercules, USA)
Geldokumentation Doc-Print-1000	(Vilber Lourmat; Torcy, Frankreich)
Gelsystem PerfectBlue Breitformat	(neoLab Migge Laborbedarf; Heidelberg, Deutschland)
Gelsystem PerfectBlue Midi S	( neoLab Migge Laborbedarf; Heidelberg, Deutschland)
Heizblock neoBlock Duo	(neoLab Migge Laborbedarf; Heidelberg, Deutschland)
Inkubationsschüttler Innova 44 Lab	(New Brunswick Scientific; Edison, USA)
Inkubator Binder BD-Serie	(Binder; Tuttlingen, Deutschland)
Kühlzentrifuge Eppendorf 5430R	(Eppendorf; Hamburg, Deutschland)
Mikroskop Axio Imager.M1	(Carl Zeiss; Oberkochen, Deutschland)
Milli-Q Wasseraufbereitungssystem	(Merck Millipore; Billerica, USA)
Nanodrop ND-1000	(Nanodrop, Wilmington, USA)
Pipetus Akku	(Hirschmann Laborgeräte; Eberstadt, Deutschland)
Power Supply EPS 301	(GE Healthcare Bio-Sciences AB; Fairfield, USA)
Sonicator Misonix S-4000 (Cup Horn)	(Misonix; Farmingdale, USA)
Stereomikroskop Discovery.V20	(Carl Zeiss; Oberkochen, Deutschland)
Taumelschüttler GFL 3011	(GFL; Burgwedel, Deutschland)
Tischzentrifuge Eppendorf 5424	(Eppendorf; Hamburg, Deutschland)
Video Drucker Mitsubishi P93	(Mitsubishi Electric Corporation; Tokio, Japan)
Vortex-Genie 2	(Scientific Industries; Bohemia, USA)
Wasserbad WNB 7	(Memmert; Schwabach, Deutschland)

## II.7 Datensätze

Die nachfolgende Tabelle 2 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit analysierten Datensätze und deren Bezugsquellen.

**Tabelle 2: In der Arbeit verwendete Datensätze**

<b>Datensatz</b>	<b>Typ</b>	<b>Quelle</b>
WUS Induktion	RNA-Seq	eigener Datensatz
WUS Induktion + Cyclo	RNA-Seq	Utan, 2012
WUS Induktion + TSA	RNA-Seq	eigener Datensatz
WUS Bindung + LinDA	ChIP-Seq	eigener Datensatz
WUS Bindung	ChIP-Seq	eigener Datensatz
WUS H3ac Regulation	ChIP-Seq	eigener Datensatz
WUS H3K27me3 Regulation	ChIP-Seq	eigener Datensatz
BPC	ChIP-Seq	eigener Datensatz
Histon 3	ChIP-Seq	Ha et al., 2011 (GSE22276)
DNaseI hypersensitive Regionen	ChIP-Seq	Zhang et al. 2012 (GSE34318)
High Occupancy Target (HOT) Regions	Binderegionen	Heyndrickx et al. 2014
WUS Induktion Zeitreihe	Microarray	Utan, 2012
Hormon Behandlungen	Microarray	Goda et al. 2008
AlcA Induktionsexperiente	Microarray	Palatnik und Lohmann
WRS/Meristem Master	Microarray	Busch et al., 2010
SAM Expressionsprofile	Microarray	Yadav et al., 2009, Yadav et al., 2014
LFY Induktion	ChIP-Seq	Moyroud et al., 2011 (GSE24568)
KAN Induktion	ChIP-Seq	Merelo et al., 2013 (GSE48081)
LFY Induktion	Microarray	Winter et al. 2011 (GSE28063)
KAN Induktion	Microarray	Reinhart et al. 2013 (GSE30702)

## **II.8 Computerausstattung**

Die bioinformatische Datenanalyse und Bildbearbeitung erfolgte an einem iMac (Apple) mit 3,4 Ghz Intel Core i7 Prozessor, 32 GB 1600 MHz DDR3 Speicher und OS X 10.8.5 Betriebssystem und folgender Softwareausstattung:

Microsoft Office 2008

Python 2.7

R 2.15.3

R Studio 0.98.501

Adobe Photoshop CS4

Adobe Illustrator CS4

Inkscape 0.48

X11 (XQuartz 2.7.5)

Geneious Pro 4.8.5

FastQC 0.10.1

Cytoscape 3.1.0

Gene Construction Kit 4.0.2

Integrative Genomics Viewer 2.3.32

ImageJ/Fiji 2.0.0

Papers2

Bowtie 2.1.0

MACS 2.0.10.2013712

SAMTools 0.1.19

BEDTools 2.17.0

FastX 0.0.13

### III. METHODEN

#### III.1 Arbeiten mit *Arabidopsis*

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Pflanzen handelt es sich um *Arabidopsis thaliana* des Labortyps *Columbia* (Col-0) und daraus erzeugte transgene Linien. Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen, d.h. 16 Stunden Licht und acht Stunden Dunkelheit auf Erde in Klimakammern oder auf Platten in Inkubatoren (Convion) angezogen.

##### III.1.1 Kultivierung auf Erde

Um den Pathogenbefall der Pflanzenkammern zu minimieren, wurden die Samen zunächst für zwei Tage bei -20°C kältebehandelt und danach Oberflächen-sterilisiert. Hierzu wurden die Samen zunächst zweimal kurz mit 70% Ethanol gewaschen und mit Wasser gespült, danach wurden sie fünf Minuten lang unter leichtem Schütteln in Bleiche inkubiert. Nach mehrfachem Spülen mit Wasser wurden die Samen in 0.1% Agarose aufgenommen und für mindestens 48 Stunden bei 4°C stratifiziert.

Die vorbereiteten Samen wurden mit Hilfe einer Pipette auf feuchte Erde ausgebracht. Jede Pflanzschale enthielt dabei je 14 schwarze Pflanzboxen. Die feuchte Erde wurde vor dem Ausbringen der Samen noch mit einer Nematoden-Suspension begossen, um die Herbivorenlast in der Erde zu reduzieren.

Zum Schutz der Keimlinge und um deren Anwachsen zu fördern, wurden die Pflanzschalen während der ersten Woche mit transparenten Kunststoffhauben bedeckt. Die angewachsenen Keimlinge wurden so vereinzelt, dass pro Pflanzbox acht Pflanzen gleichmäßig verteilt übrig blieben.

Die Pflanzen wurden in Klimakammern mit 40-60% Luftfeuchtigkeit bei 22°C unter L36W/840 Lumilux Cool White (Osram) Leuchtröhren, bzw. GreenPower LED deep red/blue 120 LO 220-240 VAC 50-60Hz 16 W (Philips) kultiviert. Die Bewässerung erfolgte über die Pflanzschalen, je nach Bedarf, etwa alle zwei Tage.

Zur Selektion von BASTA-resistenten Pflanzen wurde die Erde schon vor Ausbringen der Samen mit einer 1:10000 BASTA-Verdünnung gegossen. Nach Keimung wurden die Pflanzen zweimal im Abstand von zwei Tagen nochmals mit derselben Lösung besprüht.

##### III.1.2 Kultivierung auf Platte

Für das Heranziehen von Keimlingen auf Platte muss die Samenhülle unbedingt Oberflächen-sterilisiert werden, da diese Wachstumsbedingungen auch ideal für verschiedene Mikroorganismen sind. Hierzu wurden die Samen für zwei Minuten in einer 70% Ethanol/0,1% Triton X-100 Lösung gewaschen. Nach dieser Oberflächenbenetzung wurden die Samen für wenige Sekunden in 100% Ethanol überführt und danach auf sterilem Filterpapier in der Sterilbank getrocknet. Die trockenen Samen wurden gleichmäßig auf 0,5x MS Platten ausgebracht, die gegebenenfalls das entsprechende

Antibiotikum für eine Pflanzenselektion enthielten. Zur einfacheren Handhabung großer Mengen an Keimlingen pro Platte, konnte auf der Platte ein Ethanol-sterilisiertes Nitex 03-100/44 Gewebe (Sefar) platziert werden, auf das die Samen ausgebracht wurden. Die Platten wurden mit einem luftdurchlässigen Klebeband versiegelt und zur Stratifizierung der Pflanzen zwei bis drei Tage in Dunkelheit bei 4°C gelagert. Danach wurden sie in Pflanzeninkubatoren überführt und die Keimlinge für fünf bis sieben Tage unter Langtagbedingungen bei 22°C und 40-60% Luftfeuchtigkeit herangezogen. Zu diesem Zeitpunkt konnten die Keimlinge entweder auf Erde transferiert werden, oder weiter verarbeitet werden.

### **III.1.3 Ernte und Lagerung von Samen**

Ab einer ausreichenden Größe wurden die Pflanzen an Pflanzstäbe gebunden und in transparente Pflanztüten eingetütet. In diesen Tüten wurden die Pflanzen bis zur vollständigen Reife herangezogen und auch getrocknet. Die getrockneten Schoten der Pflanzen wurden in den Tüten zerrieben und die darin enthaltenen Samen über ein Teesieb von den Pflanzenresten getrennt. Die Samen wurden in Papiertütchen bei Raumtemperatur trocken gelagert.

### **III.1.4 Behandlung mit Chemikalien**

Viele der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente beruhen auf der präzisen Induktion der WUSCHEL-Aktivität in der Pflanze. Hierzu wurde die Pflanzenlinie *pJF359-14* (*WUS-GR*) verwendet. Sie enthält ein Transgen für ein Fusions-Protein aus dem fluoreszenten *mCherry*, dem Ratten Glucocorticoidrezeptor und WUSCHEL unter der Kontrolle des ubiquitären *UBI10*-Promoters. Die Transkriptionsfaktor-Aktivität wurde durch das synthetische Steroid Dexamethason (DEX) induziert.

Für eine globale Induktion wurden hierfür fünf bis sieben Tage alte Keimlinge in ein 50ml Reaktionsgefäß mit Induktionslösung überführt und zwei Stunden auf einem Taumelschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Für eine gleichmäßige Induktion wurde durch ein kurzes Vakuum die Luft aus den Pflanzen gezogen, so dass sich die Induktionslösung gleichmäßig in der Pflanze verteilen konnte. Für die lokale Induktion im Sprossmeristem wurden zweimal etwa je 10µl Induktionsmedium direkt auf das Infloreszenzmeristem appliziert. In gleicher Weise wurden Meristeme mit Hormonen und Inhibitoren behandelt.

### **III.1.5 Gewebepräparation**

Für die Mikroskopie von Infloreszenzmeristemen mussten diese zunächst frei präpariert werden. Unter dem Stereomikroskop wurden, mit Hilfe feiner INOX 3 Uhrmacherpinzetten (Dumont), sich entwickelnde Blüten und größere Blütenprimordien soweit entfernt, dass das Meristem frei zugänglich war.

Auf ähnliche Weise wurden Blüten für die Kreuzung vorbereitet. Hierbei wurden alle Blüten und Primordien, inklusive der Meristeme, bis auf die drei ältesten, noch nicht geöffneten Blüten am Spross mit Hilfe der Uhrmacherpinzetten entfernt. Die Blüten wurden vorsichtig geöffnet und alle sechs, noch

nicht reifen Staubblätter entfernt. Der für die Kreuzung vorgesehene Pollen wurde direkt auf die Narbe des Fruchtblatts aufgetragen, indem eine reife Blüte darüber gerieben wurde.

Für die Erstellung Zelltyp-spezifischer Chromatinprofile wurden die Gewebe nicht manuell präpariert, sondern auf Grund ihrer Fluoreszenz-Eigenschaften im Durchflusszytometer (FACS) aufgetrennt. Dazu wurden die Zellkerne der entsprechenden Reporterlinien gemäß der INTACT-Methode (Deal und Henikoff, 2011) extrahiert und, an Stelle der Affinitätsaufreinigung, im Durchflusszytometer aufgereinigt. Die Durchflusszytometrie erfolgte in der Zentralen Service Einrichtung für Durchflusszytometrie und FACS des ZMBH durch Frau Dr. Monika Langlotz an einem FACS Aria III (BD).

### **III.1.6 Pflanzen-Transformation**

Transgene Pflanzen wurden entsprechend der *Floral-Dip* Methode erzeugt (Clough und Bent, 1998). Die Selektion erfolgte je nach Resistenzmarker auf Erde oder Platte.

## **III.2 Arbeiten mit DNA**

### **III.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli***

Für Plasmid-Präparationen wurden 2ml LB-Selektionsmedium mit der entsprechenden Bakterienkolonie angeimpft und bei 37°C im Schüttler über Nacht inkubiert. Aus der resultierenden Bakterien-suspension wurden die Plasmide mit Hilfe des innuPREP Plasmid Mini Kits (Analytik Jena) gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Die Präparation aus *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte ebenso, nur dass ein größeres Suspensionsvolumen bei 28°C für zwei Tage angezogen wurde.

### **III.2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur spezifischen enzymatischen Vervielfältigung von DNA Molekülen (Mullis et al. 1986, Mullis und Faloona, 1987). Sie macht sich die Strang-Verlängerungseigenschaften und Hitzeresistenz thermostabiler DNA Polymerasen zu Nutze, um *in vitro* spezifische DNA-Fragmente exponentiell anzureichen (Saiki et al., 1988). Hierzu werden sequenzspezifische Oligonukleotide, sogenannte Primer, zu einem Reaktionsansatz bestehend aus Polymerase im entsprechenden Puffer, Desoxynukleotiden und DNA zugegeben. Die Primer werden dabei so gewählt, dass sie jeweils in 5'-3'-Richtung den beiden Enden des zu amplifizierenden DNA-Fragments entsprechen. In einer Kettenreaktion, bestehend aus mehreren Zyklen von Aufschmelzen des DNA-Doppelstrangs, Primer-Anlagerung an die DNA und enzymatischer Strangverlängerung, wird das gewünschte DNA-Fragment *in vitro* exponentiell amplifiziert.

Für diese Arbeit kam die hoch-prozessive Phusion DNA-Polymerase (ThermoScientific) zum Einsatz, die zusätzlich eine Funktion zur Korrektur von Basen-Fehlpaarungen während der Strangverlängerung aufweist. Die Reaktionen selbst wurden entsprechend den Herstellerangaben in 0,2ml PCR-Reaktions-

gefäßen angesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt dabei 1-20ng DNA, je 5µM Primer, 1mM Desoxynukleotidmix und 1U Phusion DNA-Polymerase. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler entsprechend den Herstellerangaben, wobei die Strangverlängerungszeit und die Primer-Anlagerungstemperatur entsprechend der Fragmentgröße und der Schmelzeigenschaften der Primer angepasst wurden. Ein typischer Verlauf bestand aus einem initialen Aufschmelzen des DNA-Doppelstrangs für zwei Minuten bei 95°C, vierzig Zyklen auf jeweils 30 Sekunden Aufschmelzen bei 95°C, 30 Sekunden Primer-Anlagerung bei 65°C und 40 Sekunden Strangverlängerung bei 72°C, einer abschließenden Strangverlängerung bei 72°C für zwei Minuten und einem Herabkühlen der Reaktion auf Raumtemperatur.

### **III.2.3 Quantitative PCR (qPCR)**

Die quantitative PCR erlaubt das Verfolgen der DNA-Amplifikation pro PCR-Zyklus in Echtzeit. Sie nutzt die Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green der in doppelsträngige DNA interaktiert und darauf hin, bei entsprechender Anregung, grünes Licht emittiert. Dieses Signal korreliert direkt mit der Menge an PCR-Produkt. Somit lässt sich die DNA-Menge schon während der exponentiellen Phase der PCR und nicht erst zum Endpunkt in der Sättigung messen. In dieser Phase ist die Gesamtmenge proportional zur Anfangsmenge an DNA in der Reaktion, so dass sich verschiedene Proben vergleichen lassen.

Hier wurde der Absolute SYBR Green Mix (ThermoScientific) entsprechend den Herstellerangaben verwendet und die Reaktionen im DNAEngine mit Chromo4-Aufsatz (BioRad) über die Opticon Monitor Software (BioRad) verfolgt. Jede Probe wurde als technisches Duplikat oder Triplikat gemessen. Der Schwellenwert-Zyklus (*threshold cycle*; Ct) wurde manuell für alle Proben des Durchlaufs einheitlich auf einen frühen Zeitpunkt während der exponentiellen Phase gesetzt.

### **III.2.4 Enzymatische Modifikation von DNA-Fragmenten**

Die enzymatischen Modifikationen von DNA-Fragmenten im Rahmen der Erstellung von Konstrukten erfolgte mit Enzymen von ThermoScientific gemäß den Herstellerangaben.

### **III.2.5 Agarose-Gelelektrophorese**

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte über Agarosegele im horizontalen MIDI Agarose-Gelsystem. Hierzu wurden Gele durch Aufkochen von 1% bis 1,5% Agarose in 1x TAE-Puffer hergestellt. Nach Abkühlen auf etwa 60°C wurde dem noch flüssigen Gel 0,2-0,5µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt.

DNA-Proben wurden zum Auftragen auf das Gel entsprechend mit 6x Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte in 1x TAE-Laufpuffer bei konstanter Spannung von 100V bis 130V. Die Ethidiumbromid-gefärbte DNA wurde anschließend unter UV-Licht visualisiert und gegebenenfalls mit einem Skalpell als Gelstück ausgeschnitten.

### **III.2.6 Lineare DNA Amplifikation (LinDA)**

Im Gegensatz zur PCR wurde mit der linearen DNA Amplifikation nicht ein bestimmtes Fragment exponentiell, sondern die gesamte Probe linear amplifiziert. Hierzu wurde das Protokoll von Shankaranarayanan et al. (2012; Mendoza-Parra et al., 2012) auf immunopräzipitiertes Chromatin angewandt.

### **III.2.7 DNA-Aufreinigung**

DNA aus PCR oder enzymatischen Reaktionen, sowie aus Gelstücken wurde mit Hilfe des innuPREP DOUBLEpure Kits (Analytik Jena) entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt. Bei geringer DNA-Menge, wie nach einer ChIP, wurde das MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen) gemäß dem Handbuch angewendet.

### **III.2.8 Transformation in Bakterien**

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden entsprechend dem Protokoll von Inoue et al. (1990) hergestellt und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation durch Hitzeschock wurden 50µl dieser Zellen auf Eis aufgetaut und mit 5µl bis 15µl des Ligationsansatzes versetzt. Der Ansatz wurde dann für 90 Sekunden bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Zellen für zwei Minuten wieder auf Eis heruntergekühlt und dann mit 1ml LB-Medium ohne Antibiotikum gemischt. Diese Suspension wurde für eine Stunde bei 37°C im Inkubator geschüttelt. Teile oder der gesamte Ansatz konnten dann auf Platten mit Selektionsmedium ausgebracht werden.

Für die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wurden elektrokompente Zellen verwendet, die bereits im Labor vorhanden waren. Nach dem Auftauen eines 50µl Aliquots auf Eis wurde 1µl Plasmid-DNA zugegeben und der Ansatz in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Bakterien wurden im MicroPulser (BioRad) mit 1,8kV für 4,1ms bis 4,5ms geschockt. Danach wurden die Zellen in 1ml LB-Medium ohne Antibiotikum aufgenommen und eine Stunde bei 28°C geschüttelt. Im Anschluss wurde der gesamte Ansatz auf entsprechenden Selektionsplatten selektioniert.

### **III.2.9 DNA-Sequenzierung**

Die klassische Variante der DNA-Sequenzierung beruht auf dem Kettenabbruch-Verfahren nach Sanger (Sanger et al. 1977). Durch den Einbau von fluoreszenten Didesoxynukleotiden während der Primer-vermittelten enzymatischen Replikation entstehen Kettenabbrüche an jeder einzelnen Position des zu sequenzierenden DNA-Fragments. Durch Größenauftrennung und Fluoreszenzmessung im Kapillarsequenzierer kann die Sequenz direkt abgelesen werden.

Alle in dieser Arbeit erzeugten DNA-Konstrukte wurden abschließend durch Sequenzierung überprüft und bestätigt. Die Sequenzierung erfolgte extern durch die Firma Eurofins MWG (Ebersberg, Deutschland) entsprechender ihrer Richtlinien.



Zur Sequenzierung des Gesamt-Transkriptoms oder Genoms nach Chromatin Immunopräzipitation wurde die Illumina/Solexa Sequenziermethode verwendet. Diese nutzt Clusterbildung und Sequenzierung durch Synthese um viele Millionen kurzer Einzelsequenzen parallel zu erzeugen (Mardis, 2008).

Die hierfür benötigten Bibliotheken (*libraries*) wurden von David Ibberson in der Deep Sequencing Core Facility des CellNetworks Exzellenzclusters am COS Heidelberg hergestellt und auf einem HiSeq2000 (Illumina) sequenziert. Sequenziert wurde im Multiplex-Verfahren, jeweils 50 Basenpaare von einer Seite (50bp single-end).

### **III.3 Arbeiten mit RNA**

#### **III.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen**

Das Pflanzengewebe wurde unmittelbar nach der Ernte in flüssigem Stickstoff schockgefroren und entweder für wenige Tage bei -80°C eingelagert, oder sofort im eiskalten Mörser zu Pulver zerrieben. Die RNA-Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kits (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben. Die Qualität jeder Präparation wurde zunächst durch Gelelektrophorese in einem 1% Agarosegel und durch Messung im NanoDrop überprüft.

#### **III.3.2 Quantitative Reverse-Transkriptase PCR (qRT-PCR)**

Zur Bestimmung der relativen Transkriptmenge bestimmter Gene unter verschiedenen experimentellen Bedingungen wurde die qPCR-Methode auf cDNA angewandt. Hierzu wurde qualitativ hochwertige mRNA durch reverse Transkription in cDNA enzymatisch umgeschrieben. Zunächst wurden durch eine DNase-Behandlung mögliche DNA-Verunreinigungen aus der RNA-Präparation entfernt. Etwa 2µg gesamt-RNA in 8µl wurden mit 1µl RNase-freier DNase (ThermoScientific) und 1µl 10x DNase Puffer versetzt und 25 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1µl 50mM EDTA für zehn Minuten bei 65°C gestoppt. Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des revertAid First Strand cDNA Synthesis Kits (ThermoScientific). Zum DNA-freien Ansatz wurde 1µl Oligo-(dT)<sub>18</sub> Primer zugegeben. Die RNA wurde bei 70°C für fünf Minuten linearisiert und sofort auf Eis gekühlt. Dort wurden zunächst 1µl RNase-Inhibitor (20U/µl), 4µl 5x Reaktionspuffer und 2µl 10mM dNTP-Mix zugegeben und die Reaktion bei 37°C für fünf Minuten vor-inkubiert. Durch Zugabe von 1µl Reverser Transkriptase wurde die Reaktion gestartet und für 60 Minuten bei 42°C durchgeführt. Die Reaktion wurde bei 70°C für zehn Minuten beendet und der Ansatz mit 80µl Wasser verdünnt.

Pro qPCR-Reaktion wurden je 2µl cDNA eingesetzt. Für die qRT-PCR wurden die Qualitätsstandards beachtet (Udvardi et al., 2008). Als interne Standards wurden die Standard-Referenzen, die Gene AT1G13320, AT4G26410, AT4G34270 und AT5G15710, verwendet (Czechowski et al., 2005). Die relative Mengenbestimmung erfolgte durch Normalisierung gegen die internen Standards entsprechend der  $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001).

### III.3.3 RNA-Seq

Qualitativ hochwertige RNA-Präparationen wurden zur Erstellung von Illumina Sequenzier-Bibliotheken verwendet. Die Herstellung und Sequenzierung erfolgte durch David Ibberson in der Deep Sequencing Core Facility des CellNetworks Exzellenzclusters am COS Heidelberg.

Die Sequenzierung erfolgte im Multiplex-Verfahren, jeweils 50 Basenpaare von einer Seite (50bp single-end) auf den hauseigenen HiSeq2000 (Illumina).

## III.4 Arbeiten mit Chromatin

### III.4.1 Chromatin-Immunopräzipitation

Mit Hilfe der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) lassen sich Interaktionsbereiche auf der DNA mit spezifischen Proteinen ermitteln. Hierzu wird das Chromatin, die DNA mit assoziierten Proteinen, chemisch fixiert und enzymatisch oder mechanisch in kleine Fragmente zerlegt. Die gewünschten Fragmente werden mit Hilfe eines Antikörpers, der spezifisch das entsprechende Protein erkennt, isoliert. Nach chemischer Reversion der Fixierung und enzymatischem Verdau des Proteinanteils stehen die DNA-Fragmente für weitere Analysen wie qPCR oder Sequenzierung zur Verfügung.

In dieser Arbeit kam im Wesentlichen ein Standardprotokoll (Gendrel et al., 2005) mit einigen Anpassungen zum Einsatz.

Nach fünf Tagen Wachstum auf Platte wurden jeweils etwa 3g Keimlinge der Linie *JF359-14* (*WUS-GR*) und der Kontrolle *Col-0* geerntet und mit Induktionslösung für zwei Stunden behandelt. Danach wurden sie in Fixierlösung überführt und unter Vakuum dreimal für zehn Minuten fixiert. Die Formaldehydkonzentration wurde gegenüber dem Standardprotokoll auf 0,33% reduziert, um eine Überfixierung zu vermeiden. Die Vorbehandlung in der Induktionslösung scheint die effektive Konzentration in der Zelle zu erhöhen. Die Fixierung wurde durch Verdünnung mit Glyzerin zu einer Endkonzentration von 125mM und Vakuum-Inkubation für fünf Minuten gestoppt.

Das Gewebe wurde zwischen Papiertüchern getrocknet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. So konnte es für einige Monate bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingelagert oder direkt weiterverarbeitet werden.

Die Zellkern-Präparation erfolgte mit kleinen Anpassungen entsprechend der INTACT-Methode (Deal und Henikoff, 2011).

Das gefrorene Gewebe wurde im tiefgekühlten Mörser für etwa zehn Minuten zu feinem Pulver zerrieben. Nachdem das Pulver bis etwa zum Gefrierpunkt aufgetaut war wurde es in 10ml eiskaltem Kernpräparationspuffer gelöst. Die Suspension wurde durch zwei Schichten Siebgewebe mit 95µm und 50µm Porengröße (Neolab 2-4070 und Neolab 2-4066) gefiltert und größere Partikel bei 1260xg für zehn Minuten bei 4°C vorsichtig pelletiert. Das Pellet wurde vorsichtig in Kernpräparationspuffer mit 0,1% Triton X-100 aufgelöst. Das Detergens soll zur Lyse aller Membranen, mit Ausnahme der

Lamin-geschützten Kernmembran führen. Durch Zentrifugation bei 1260xg für zehn Minuten bei 4°C wurde ein Kernpellet gewonnen, das in 0,5ml Sonifizierungspuffer aufgenommen wurde. Die Lösung wurde in ein 1,5ml Zentrifugengefäß überführt.

Das Chromatin wurde im gekühlten Ultraschallbad entsprechend der Empfehlungen von Fan et al. (2008) fragmentiert. Unlösliche Partikel wurden durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für fünf Minuten bei 4°C entfernt.

Je 150µl der geklärten Lösung wurden mit neun Volumen ChIP Verdünnungspuffer verdünnt und für die Immunopräzipitation eingesetzt. 10µl wurden als Input-Kontrolle zurückgehalten.

Die Suspension wurde bei 4°C mit 20µl Protein A Agarose-Kügelchen für eine Stunde auf dem Rotationsinkubator präabsorbiert. Die Kügelchen wurden bei 3500xg für zwei Minuten bei 4°C abgetrennt, und der Überstand mit 20µl RFP-Trap oder 2,5µg des entsprechenden Antikörpers versetzt. Die Antikörper-Antigen Reaktion erfolgte bei 4°C auf dem Rotationsschüttler über Nacht. Im Falle einer ChIP mit Antikörper wurden 20µl Protein A Agarose-Kügelchen zugegeben und für eine weitere Stunde inkubiert.

Die Kügelchen mit den gebundenen Fragmenten wurden bei 3500xg für zwei Minuten bei 4°C abgetrennt und der ungebundene Überstand verworfen. Unspezifische Interaktionen mit den Kügelchen wurden durch zweifaches Waschen in je 500µl Niedrigsalz-Waschpuffer, 500µl Hochsalz-Waschpuffer und LiCl-Puffer für je fünf Minuten bei 4°C im Rotationsschüttler entfernt. Anschließend wurden die Kügelchen in TE-Puffer umgepuffert und in ein frisches 1,5ml Zentrifugengefäß überführt.

Der Überstand wurde möglichst vollständig entfernt und die Kügelchen in 250µl frisch angesetzttem Elutionspuffer aufgenommen. Die Suspension wurde für eine Minute auf dem Vortexschüttler intensiv gemischt und für weitere 15 Minuten bei 65°C und 1300Upm inkubiert. Dadurch wurde die Interaktion zwischen den Protein A Agarose-Kügelchen und den Antikörper-gebundenen Chromatinfragmenten gelöst. Der Überstand mit den gelösten Fragmenten wurde in ein frisches, oberflächenoptimiertes 1,5ml Zentrifugengefäß überführt und die Kügelchen ein zweites Mal mit 250µl Elutionspuffer gewaschen. Die beiden Überstände wurden vereinigt und die zurückgehaltene Input-Kontrolle mit 500µl Elutionspuffer versetzt.

Die Auflösung der Fixierung und die anschließende DNA-Aufreinigung erfolgte für sowohl die ChIP-Reaktionen als auch die Input-Kontrolle.

Zu den 500µl Chromatin in Elutionspuffer wurden 20µl 5M NaCl zugegeben und die Formaldehydvermittelten Bindungen zwischen den Lysinen der Proteine und Cytosinen der DNA bei 65°C über Nacht rückgängig gemacht. Danach wurden 10µl 0,5M EDTA (pH 8,0), 20µl 1M Tri-HCl (pH 6,5) und 1µg RNase A (ThermoScientific) zugegeben und Verunreinigungen durch RNA mit 20 Minuten

Verdau bei 37°C beseitigt. Der Proteinanteil wurde durch Zugabe von 2µg Proteinase K (Roche) und Inkubation für eine Stunde bei 55°C verdaut.

Die saubere DNA wurde mit Hilfe des MinElute Reaction Cleanup Kits (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt. Die DNA wurde mit 50µl Injektionswasser eluiert.

Der Erfolg jeder ChIP wurde per qPCR validiert. Dabei wurde der prozentuale Anteil eines Positiv- und Negativ-Kontroll-Locus nach der ChIP gegenüber der Input-Kontrolle ermittelt.

#### **III.4.2 ChIP-Seq**

Sechs bis neun validierte ChIPs wurden als biologische Duplikate oder Triplikate vereinigt und zur Erstellung von Illumina Sequenzier-Bibliotheken an die Deep Sequencing Core Facility des CellNetworks Exzellenzclusters am COS Heidelberg übergeben. Die Bibliothek-Synthese und Sequenzierung am Haus eigenen HiSeq2000 (Illumina) erfolgte durch David Ibberson. Es wurden jeweils 50 Basenpaare von einer Seite (50bp single-end) im Multiplex-Verfahren sequenziert.

#### **III.5 Mikroskopie**

Ganze Pflanzen und Pflanzenteile wurden mit einer D60 Digitalkamera (Nikon) dokumentiert. Für stärkere Vergrößerungen wurden das Discovery.V20 Stereomikroskop mit AxioCam HRc Kamera (beides Carl Zeiss), oder das Axio Imager.M1 Mikroskop (Carl Zeiss) jeweils mit AxioVision Software verwendet.

Die konfokale Mikroskopie erfolgte am Nikon A1 Konfokalmikroskop und wurde von Dr. Gabor Daum durchgeführt. Die Probenpräparation und Mikroskopie entsprach dabei dem Standardprotokoll (von Wangenheim et al., 2014).

#### **III.6 Bioinformatische Datenanalyse**

##### **III.6.1 Microarray Analyse**

Die Analyse der *Arabidopsis*-spezifischen ATH1 Microarrays (Affymetrix) erfolgte in der R Softwareumgebung mit grafischer Oberfläche R-Studio und Bioconductor-Erweiterung (Gentleman et al., 2004).

Die Rohdaten wurden zunächst GCRMA-normalisiert (Wu et al., 2004) und differentiell exprimierte Gene mit dem LIMMA Packet identifiziert (Ritchie et al., 2015). Die Zuordnung der Gene zu den Array-Elementen erfolgte gemäß der aktuellen Annotation in TAIR10 ([ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair/Microarrays/Affymetrix/affy\\_ATH1\\_array\\_elements-2010-12-20.txt](ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair/Microarrays/Affymetrix/affy_ATH1_array_elements-2010-12-20.txt)).

##### **III.6.2 ChIP-Seq Analyse**

Die Qualität der Rohsequenzen wurde zunächst in FastQC (Babraham Bioinformatics) überprüft. Linkersequenzen oder Basen mit schlechter Qualität wurden gegebenenfalls mit dem FASTX-Toolkit

entfernt bevor die einzelnen Sequenzen im Referenzgenom kartiert wurden. Hierzu wurde Bowtie2 mit der *local alignment* Einstellung verwendet (Langmead und Salzberg, 2012). Die hierzu notwendige Bowtie2 Index-Datei war bereits im iGenome Packet für *Arabidopsis thaliana* (Illumina) enthalten. Die hieraus resultierenden Sequence Alignment/Map (sam)-Dateien konnten mit Hilfe von SAMtools (Li et al. 2009) eingehender untersucht und kombiniert werden, oder in binäre Versionen (bam) umgewandelt und geindext (bai) werden.

Protein-Bindestellen wurden mit der Software Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS2) identifiziert (Zhang et al., 2008). Folgende Parameter wurden zusätzlich gesetzt: -g 1.57e8 --keep-dup auto --mfold 8 30 -B. Für ChIP-Seq Experimente auf Histon-Modifikationen wurde zusätzlich der Parameter --broad verwendet. Bei offensichtlich falsch errechneter Fragmentgröße wurde diese manuell auf die Größe eines Nukleosoms gesetzt über --nomodel --extsize 146 --shift-control. Neben einer Datei mit den genomischen Positionen und Länge, der jeweiligen Anreicherung und eines statistischen Werts für jede Bindestelle (bed), wurde zusätzlich eine Datei zur Visualisierung (bedgraph) im Integrated Genomics Viewer (Thorvaldsdottir et al., 2013) erzeugt. Zur besseren Darstellung der WUSCHEL-Bindestellen wurde mit Hilfe der Unterfunktion bdgcmp -m qpois der Kontroll-Experiment-Track vom Experiment-Track abgezogen.

Die Annotation der Bindestellen zu den jeweiligen Gen-Loci erfolgte über das Programm Hypergeometric Optimization of Motif EnRichment (HOMER) mit dessen Hilfe auch die Sequenzen 200bp um die Bindestellen-Zentren extrahiert wurden (Heinz et al., 2010).

Die Suche nach überrepräsentierten Motiven in diesen Sequenzen erfolgte durch MEME Suite (Bailey et al., 2009). Die Hintergrundverteilung der Basen wurde aus den im Keimling zugänglichen Bereichen des Chromatins (Zhang et al., 2012) errechnet.

### **III.6.3 RNA-Seq Analyse**

Die Qualitätskontrolle der Rohsequenzen erfolgte analog zu ChIP-Seq Rohdaten mit FastQC und FASTX.

Die Kartierung der Sequenzen erfolgte durch TOPHAT2 (Kim et al., 2013) gegen denselben Index wie Bowtie2. Differenziell exprimierte Transkripte wurden mit Hilfe des Programms Cufflinks2 (Trapnell et al., 2013) identifiziert. Die dazu benötigt Genom-Transferdatei (gtf) mit den Annotationen aller *Arabidopsis* Transkripte war im iGenome Paket (Illumina) enthalten.

### **III.6.4 Meta-Analyse**

Entsprechend der ursprünglichen Definition (Glass, 1979) wurden die Ergebnisse aus ChIP-Seq, RNA-Seq, Microarray und aus externen Quellen einer Meta-Analyse unterzogen, um ein möglichst vollständiges Bild der molekularen und biologischen Funktion von WUSCHEL zu erhalten. Diese Form der Analyse von Expressionsdaten wurde in der Vergangenheit bereits sehr erfolgreich zur

Verbesserung der Sensitivität des Gesamtexperiments, durch Verringerung der Fehler erster und zweiter Ordnung, angewandt (Levesque et al., 2006; Fulton et al., 2009; Busch et al., 2010; Schuster et al., 2014).

Das Auffinden von Mustern erfolgte durch hierarchisches Clustering mit Pearson Korrelation und Ward-Linkage (Ward, 1963). Hierzu wurden sämtliche Gene verwendet, die einen Expressionswert für sowohl die experimentellen als auch die Kontroll-Bedingungen in den Microarray- und RNA-Seq-Experimenten aufwiesen. Unabhängig von der statistischen Signifikanz flossen die jeweiligen *log2 fold changes* in die Analyse ein. Für jedes dieser Gene wurden zusätzlich die *tags* im Bereich des Promoters und des Terminators in den jeweiligen bedgraph-Dateien nach der ChIP-Seq Analyse gezählt und als Z-transformierte Werte (Busch et al. 2010; Schuster et al. 2014) eingesetzt. Als Promoter wurde empirisch der Bereich bis 1,5kbp oberhalb des Transkriptionsstarts (TSS) gewählt. Der Terminator umfasste den Bereich bis 500bp unterhalb der Transkriptionsterminationsstelle (TTS). Das Clustering und die Visualisierung als *heatmap* erfolgte im R Packet *gplots* (Warnes et al., 2012) mit der Farberweiterung *RColorBrewer* (Neuwirth, 2007).

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) von Microarray-Experimenten erfolgte in R. Zur Visualisierung von drei-dimensionalen Punktdiagrammen wurde die *scatterplot3d* Erweiterung (Ligges und Mächler, 2003) verwendet.

Für den Vergleich von gebundenen Regionen in verschiedenen ChIP-Seq Experimenten wurde das Programm *BEDTools* (Quinlan, 2014) verwendet.

Sämtliche statistischen Auswertungen erfolgten in R. Für die Projektion von Werten auf Vektordiagrammen wurde die Erweiterung *SVGMapping* (Leplat et al., 2013) verwendet.

Die Analyse von Genlisten auf Überrepräsentation von Genontologien wurde in der Cytoscape-Erweiterung *BinGO* (Shannon et al., 2003; Maere et al., 2005) durchgeführt. Als Referenz diente eine Liste der Gene die im *Arabidopsis* Keimling mit offenem Chromatin assoziiert sind (Zhang et al., 2012).

Zusätzlich wurden die Genlisten in der „Plant hormone signal transduction“-Karte der Kyoto Enzyklopädie der Gene und Genome (KEGG) kartiert (Ogata et al., 1998).

### **III.6.5 Bild Analyse**

Digitale Mikroskopiebilder wurden in Fiji (Schindelin et al., 2012) analysiert. Für die Analyse der Zellgröße wurde die Methode aus Talbot und White (2013) für konfokale Bilder adaptiert. Ausgewertet wurden die kombinierten Bilderstapel der Epidermis des zentralen Meristems.

## IV. ERGEBNISSE

Die Stammzellpopulation des apikalen Sprossmeristems (SAM) wird maßgeblich durch den Transkriptionsfaktor WUS reguliert. Er wird im oberen Teil des Rippenmeristems (RM), dem sogenannten Organisierenden Zentrum (OC), exprimiert und wandert als Protein durch Plasmodesmata in die darüber liegenden Stammzellen der Zentralen Zone (CZ) (Mayer et al., 1998; Daum et al. 2014). Die Gegenwart von WUS-Protein in den Stammzellen ist notwendig, um ihre Identität zu erhalten und die vorzeitige Differenzierung zu verhindern (Daum et al. 2014; Yadav et al., 2011). Obwohl diese Bedeutung von WUS seit langem bekannt ist, ist seine Funktion auf molekularer Ebene nachwievor wenig verstanden. Als Transkriptionsfaktor wird WUS zumindest einen Teil seiner Funktion über die Regulation von transkriptionellen Netzwerken ausüben. Durch die Identifizierung von einzelnen Zielgenen, die direkt durch WUS reguliert werden, konnten bereits Teile dieses Netzwerks aufgeklärt werden (Leibfried et al., 2005; Lohmann et al., 2001). Sie können die Bedeutung von WUS für die Stammzellidentität jedoch nur unzureichend erklären. In einem Vorgänger zu dieser Arbeit wurde daher versucht diese punktuellen Informationen durch einen globalen Ansatz zu komplementieren (Busch et al., 2010). Durch eine Kombination aus Genom-weiten Bindedaten und WUS-abhängigen Transkriptomdaten sollte die Funktion von WUS vollständig erfasst und abgebildet werden. Dieser Ansatz konnte einige wertvolle Erkenntnisse liefern, aber auf Grund von technischen Einschränkungen blieb das globale Bild relativ grob.

Aufgabe dieser Arbeit war es daher die Funktion von WUS auf molekularer und biologischer Ebene möglichst hochauflösend abzubilden, um ein Modell zum Erhalt der Stammzellidentität erstellen zu können. Hierzu mussten zunächst die Gene identifiziert werden, deren Promotoren direkt durch WUS gebunden werden, um sie mit WUS-abhängigen Transkriptomdaten abgleichen zu können. Diese direkt durch WUS regulierten Gene stellen die oberste Ebene des WUS-abhängigen transkriptionellen Netzwerks dar.

Dieses Vorhaben wurde durch zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt: 1) Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) und anschließende Sequenzierung (ChIP-Seq) mit einem WUS-spezifischen Antikörper auf aufgereinigte Zellkerne des OC und der Stammzellen, und 2) ChIP-Seq auf ganze Keimlinge einer Modell-Pflanzenlinie, in der die WUS-Funktion chemisch induziert werden konnte, mit einem Antikörper gegen den mCherry-Tag des Fusionsproteins. Während der erste Ansatz den tatsächlichen Zustand im Meristem abbildet, nutzt der zweite Ansatz die zeitliche Komponente und die Eigenschaft von WUS Stammzellidentität zu induzieren.

### IV.1 Aufreinigung Gewebe-spezifischer Zellkerne für ChIP-Seq

Auf Grund der sehr geringen Anzahl an Stammzellen und Zellen des OC im Keimling ist es notwendig, diese Zellpopulationen eindeutig zu markieren. Nur so können sie in einem Extrakt

identifiziert und daraus isoliert werden. Diese Isolation muss sehr sauber erfolgen, da selbst geringe Verunreinigungen die Ergebnisse stark beeinflussen können.

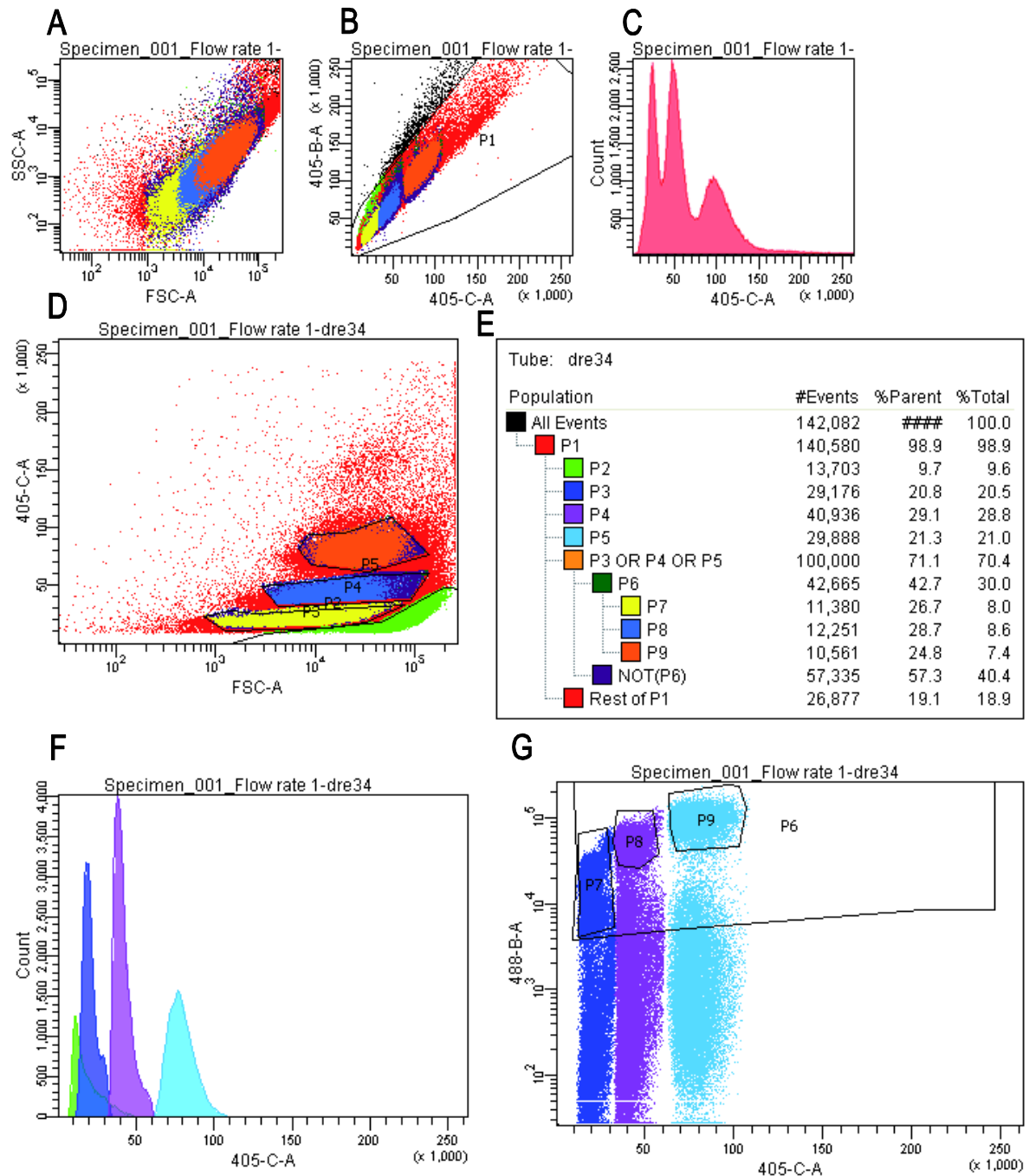
Während Protoplastieren und anschließendes Sortieren der Einzelzellen nach Gewebespezifität sehr erfolgreich für die Erstellung von Gewebe-spezifischen Transkriptomprofilen der Wurzel durchgeführt werden konnte (Birnbaum et al., 2003), war ein derartiges Verfahren im Spross nur bei einer Mutante (*ap1/cal*) erfolgreich, bei der die einzelnen Gewebe des apikalen Sprossmeristems massiv überproliferieren (Yadav et al., 2009, 2014). In wieweit diese Mutante den Zustand im Wildtyp abbildet ist unklar. Nachdem das Erzeugen von Protoplasten einerseits eine deutliche Veränderung des Transkriptoms zur Folge hat und andererseits fixiertes Gewebe nicht protoplastiert werden kann, da die Protoplasten platzen, wurde dieses Verfahren zur Gewinnung von Zelltyp-spezifischem Chromatin für ChIP-Seq verworfen.

Stattdessen sollten direkt die Zellkerne des jeweiligen Zelltyps aus fixiertem Gewebe isoliert und sortiert werden. Die Gewebefixierung verhindert dabei eine nachträgliche Veränderung des Chromatin-Zustands, ist aber gleichzeitig auch eine Voraussetzung für die anschließende ChIP. Die Analyse und Sortierung der Kernpopulationen erfolgte am Durchflusszytometer (FACS) als Adaption der gängigen Ploidiemessung. Die besondere Eigenschaft des Gewebes erforderte jedoch zunächst eine Optimierung des Kernextraktionsverfahrens.

#### **IV.1.1 Gewinnung der Zellkernpopulation aus Gewebeextrakt durch Durchflusszytometrie**

Die für diese Arbeit interessanten Zellkernpopulationen, nämlich die WUS exprimierenden Zellen und die Stammzellen, stellen mit je unter hundert Zellen pro Keimling einen verschwindend kleinen Anteil an der Gesamtpopulation dar. Umso wichtiger ist es, die Zellkernpopulation innerhalb des Gewebeextrakts möglichst exakt ansprechen zu können. Daher musste zunächst die *Gating*-Strategie am FACS für Zellkerne optimiert werden. Sie ist in Abbildung 1 exemplarisch für Kerne der Epidermis (pML1::H2B-3xYFP-NLS) dargestellt.





**Abb. 1: Gating-Strategie für Zellkerne.**

**A,B,D** Streudiagramme einer Zellkernaufreinigung. **A** Lichtstreuungseigenschaften vorwärts (FSC-A) gegen seitwärts (SSC-A). **B** Korrelation der DAPI-Signale in zwei unabhängigen Detektoren (405-B-A und 405-C-A) und *Gate* für Population P1. **C** Histogramm des DAPI-Signals (405-C-A) der Population P1. **D** Lichtstreuung vorwärts gegen DAPI-Fluoreszenz der Population P1 mit *Gates* für die Populationen P2-5. P3-5 repräsentieren den Zellkernanteil der Präparation. **E** Legende der einzelnen Populationen mit Gesamtzahl und relativem Anteil. **F** Histogramm des DAPI-Signals (405-C-A) der Populationen P2-5. **G** YFP-Fluoreszenzeigenschaften (488-B-A) gegen DAPI-Signal (405-C-A) der Populationen P3-9.

Nach dem Gewebeaufschluss wurde der Pflanzenextrakt in Kernpräparationspuffer aufgenommen und große Bestandteile durch Zentrifugation und Filtration entfernt, um ein Verstopfen der Düse des FACS

zu verhindern. Somit wurde die Kernfraktion noch vor der Sortierung angereichert. Dennoch war der Hintergrund an Zelltrümmern nachwievor so hoch, dass der Auslöser des FACS auf den DAPI-Kanal (405nm) gestellt wurde, um nur Fragmente zu detektieren die Chromatin-Färbung aufwiesen. Aus dem Vergleich aus Lichtstreuung vorwärts (FSC) und seitwärts (SSC) ließ sich keine Kernsignatur ableiten. Daher wurden die beiden unabhängigen Detektoren für 405nm (405-B und 405-C) dafür verwendet, um die Partikel auszuwählen, die einen linearen Zusammenhang zwischen beiden Kanälen aufwiesen (Gate P1). Ein Histogramm dieser Population wies bereits eine deutliche Kernsignatur auf. Die Signale waren größtenteils auf einzelne, normalverteilte Populationen verteilt, deren Signalintensität exponentiell und deren Signalbreite etwa linear zunahmen. Während die Verdopplung der Signalintensität sehr gut zu Zellen in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus, oder der Endoreduplikation passt, geht die Verbreiterung der Populationen auf technische Eigenschaften des Durchflusszytometers zurück. Diese DAPI-positive Population konnte auf Grund ihrer Lichtstreuungseigenschaften noch genauer aufgetrennt werden (405-C gegen FSC) und die einzelnen Zellkernpopulationen direkt angesprochen werden (Gates P3, P4 und P5). Diese konnten nun insgesamt (Gate P6), oder einzeln (Gates P7-9) auf die Gegenwart von Gelbfluoreszierenden Proteinen (YFP)-Signal hin untersucht und sortiert werden (405-C gegen 488-B). An Hand dieser Einstellungen wurden die Extraktionsmethoden optimiert und die verschiedenen Reporterlinien miteinander verglichen.

#### **IV.1.2 Optimierung der Zellkernextraktion für die Gewinnung von Zelltyp-spezifischem Chromatin für ChIP-Seq**

Die Gewinnung von Ausgangsmaterial für die Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) zur Erstellung Zelltyp-spezifischer Chromatinprofile ist nur der erste, aber limitierende Schritt. Denn für den Erfolg einer ChIP und besonders für die anschließende Sequenzierung ist die Menge an Ausgangsmaterial entscheidend. Nachdem die zu erwartende Menge an Zelltyp-spezifischem Chromatin pro Pflanze ohnehin sehr gering war, war es umso wichtiger die Effizienz der Extraktion zu optimieren. Dabei war jedoch zu beachten, dass das Ausgangsgewebe fixiert war und der Aufschluss des Gewebes durch mahlen im Mörser erfolgen musste, da die Zellen des SAM zu klein sind, um die Zellkerne schadlos durch häckseln freizusetzen. Unter diesen Vorgaben wurde die Zellkernextraktion mit verschiedenen Puffern verglichen. Verwendet wurden Galbraiths (Galbraith et al., 1983) Standardpuffer GBB (45mM  $\text{MgCl}_2$ , 30mM NaCitrat, 20mM MOPS, 1% Triton-100), der INTACT Puffer NPbt (Deal und Henikoff, 2011) und eine Variante mit zusätzlich 45mM  $\text{MgCl}_2$  (NPbt+). Abbildung 2 zeigt eine Gegenüberstellung der verschiedenen Puffer im Überblick.

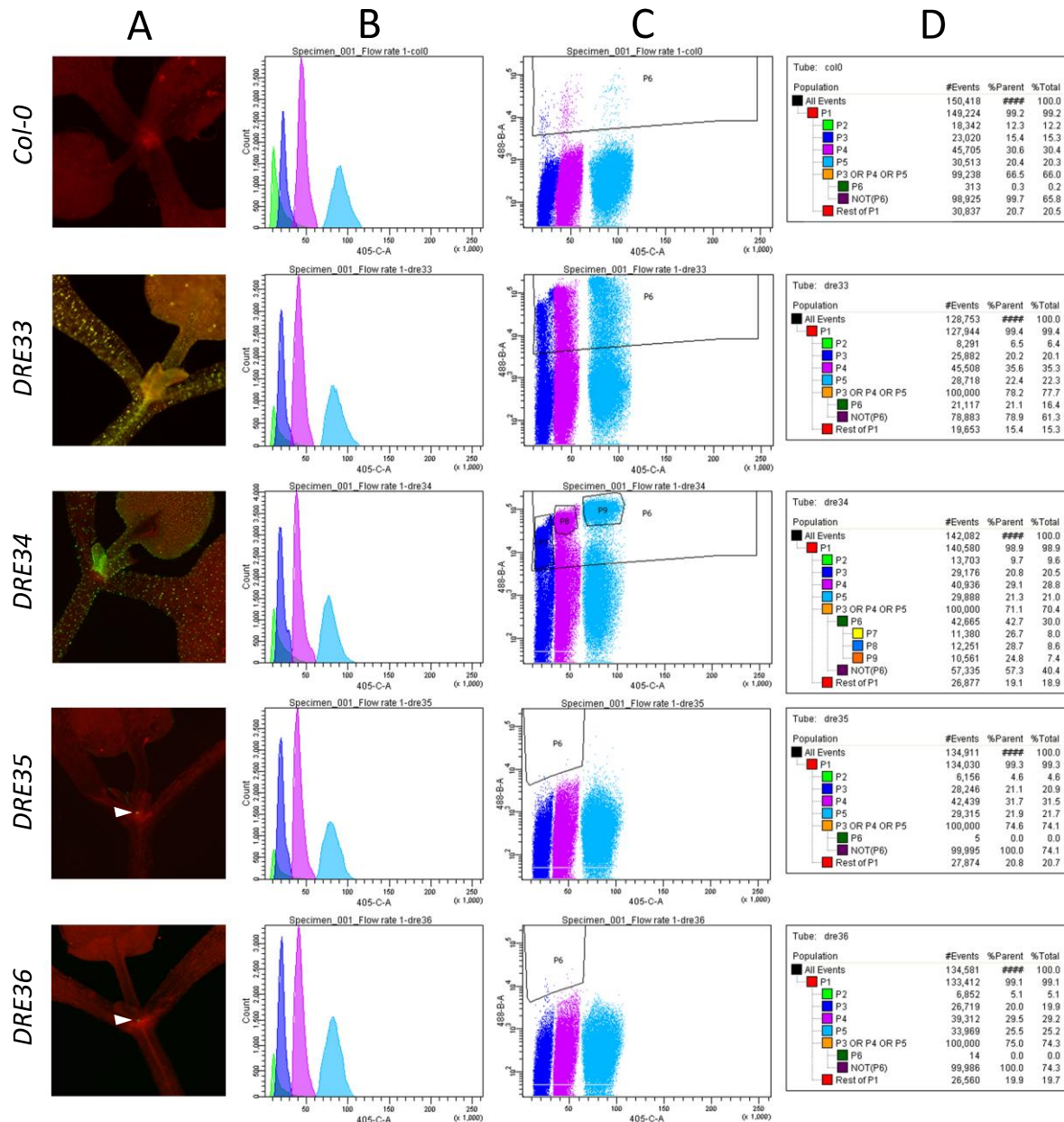


Alle drei Puffer erlauben eine saubere Detektion der Zellkerne (Abb. 2). Bei einer Extraktion durch Häckseln von frischem Gewebe direkt im Puffer lassen sich durchgehend sehr saubere Ergebnisse erzielen, der NPbt-Puffer stabilisiert die Zellkerne jedoch offenbar nicht so gut, da die Trennschärfe bei einer Präinkubation des Gewebes über Nacht im Puffer deutlich herabgesetzt wird. In den beiden anderen Puffern wirkt sich selbst eine sehr lange Inkubationszeit weniger deutlich aus. Die Fixierung des Gewebes erhöht insgesamt den Hintergrund. Die Präparationen in den drei Puffern unterschieden sich jedoch nicht. Bei gemahlenem, fixiertem Gewebe nimmt die Zahl an identifizierbaren Zellkernen deutlich ab, der Hintergrund an kleinen Fragmenten (Gate P2) nimmt jedoch im GBB-Puffer besonders stark zu. Nachdem der NPbt-Puffer ohnehin für die Präparation von Zellkernen für ChIP entwickelt wurde und diese Präparation ein besseres Verhältnis von Signal zu Hintergrund aufweist, wurde dieser Puffer für die Extraktion von Zellkernen für die Zelltyp-spezifische Sortierung gewählt. Zusätzlich wurden ihm 45mM MgCl<sub>2</sub> zugesetzt, um die Kerne auch über den teils mehrstündigen Sortierungszeitraum zu stabilisieren.

#### **IV.1.3 Zelltyp-spezifische Kernaufreinigung**

Um Zelltyp-spezifische Kerne durchflusszytometrisch aufreinigen zu können, müssen diese fluoreszent markiert werden. In diesem Fall erfolgte die Markierung genetisch über die Zelltyp-spezifische Expression eines Fusions-Proteins aus Histon 2B (H2B) und YFP. Die Stammzellspezifität wurde durch Verwendung des Promoters des Stammzellmarkers *CLV3* (*pCLV3*) gewährleistet. Die Kerne des OC wurden durch den *WUS*-Promoter (*pWUS*) spezifiziert. Als Positivkontrolle für fluoreszent markierte Zellkerne diente einerseits ein ubiquitär aktiver Promoter des Tabak Mosaik Virus (*p35S*) und andererseits ein epidermale Promoter (*pML1*). Das korrekte Expressionsmuster wurde jeweils mikroskopisch verifiziert (Abbildung 3A) und für jedes Konstrukt eine genetisch stabile, homozygote Pflanzenlinie mit einer einzelnen Insertion etabliert.

Diese, und als Negativkontrolle der Wildtyp *Col-0*, wurden verwendet, um gemäß der optimierten Bedingungen die Zellkerne zu präparieren und zu sortieren (Abbildung 3). Dabei wurden jeweils etwa 3g fünf bis sieben Tage alte Keimlinge verarbeitet. Die Messung der Negativkontrolle, die keine Markierung enthielt, ergab einen falsch-positiven Signalhintergrund von etwa 0,3%. Die einzelnen Signale zeigten kein spezifisches Muster im YFP-Kanal (Abbildung 3C) und konnten auch mikroskopisch nicht als YFP-positive Zellkerne bestätigt werden (keine Abbildung). Man darf daher annehmen, dass es sich dabei tatsächlich um einen unspezifischen Signalhintergrund handelt.



**Abb. 3: Zelltyp-spezifische Kernaufreinigung.**

**A** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Zelltyps in grün (YFP); Autofluoreszenz in rot; Pfeile weisen auf kleine markierte Zellpopulation. **B** Histogramm des DAPI-Signals (405-C-A) der Zellkernpopulationen. **C** YFP-Fluoreszenzeigenschaften (488-B-A) gegen DAPI-Signal (405-C-A) der Gesamtkernpopulation mit Anteil an YFP-positiven Kernen P6-9. **D** Legende der einzelnen Populationen mit Gesamtzahl und relativem Anteil.

Die ubiquitäre Positivkontrolle *DRE33*, in der jeder Zellkern markiert sein sollte, wies lediglich eine Rate von etwas über 20% an positiven Kernen auf, die allerdings mikroskopisch bestätigt werden konnten (kein Abbildung). Eine falsch-negativ Rate für die Sortierung lässt sich hieraus jedoch nicht ableiten, da der tatsächliche Anteil an YFP-positiven Zellkernen in der Präparation nicht abgeschätzt werden kann. Die relativ gleichmäßige Verteilung der Signale im YFP-Kanal lässt jedoch auf eine sehr heterogene Kernpopulation schließen. Während diese Kontrolle deutliche Hinweise auf technische Probleme während der Gewebebehandlung oder Kernpräparation liefert, bestätigt die

Epidermis-spezifische Kontrolle (*DRE34*) die Methode. Der Anteil von über 40% positiver Kerne liegt recht hoch, ist aber für junge Keimlinge noch plausibel. Etwa 80% dieser positiven Signale formen distinkte Gruppen im YFP-Kanal und lassen somit eine hohe Homogenität dieser Kernpopulation erkennen. Der Vergleich der beiden Positivkontrollen macht Unterschiede in der Effizienz der Methode beim Aufreinigen verschiedener Gewebe deutlich. Die Aufreinigung von Zellkernen der Stammzellen (*DRE35*) und der Organisatorzellen (*DRE36*) bestätigt dies. Diese Zelltypen stellen nicht nur einen sehr geringen Anteil des Keimlings, sie zeichnen sich auch durch ihre geringe Größe aus. Die Extraktion dieser Zellkerne ist demnach wesentlich schwieriger als die von großen Zellen der Epidermis. Für die durchflusszytometrische Aufreinigung dieser Zelltypen wurden nur Kerne in Betracht gezogen, die keine Endoreduplikation durchgemacht hatten, da diese in den zentralen Zellen des Meristems nicht stattfindet. Für beide Zelltypen wiesen, selbst bei der Analyse von über 1 000 000 Zellkernen, unter 0,001% der Zellkerne eine Markierung auf. Diese Rate ist so gering, dass sich keine Aussage über die Gruppierung dieser Signale im YFP-Kanal treffen lässt. Nachdem selbst der Hintergrund zwei Größenordnungen oberhalb dieser Rate lag, ist auch die Qualität dieser Analyse ungewiss. Weder die Stammzellen noch die Zellen des Organisierenden Zentrums ließen sich mit dieser Methode eindeutig identifizieren und quantitativ für nachfolgende Anwendungen aufreinigen.

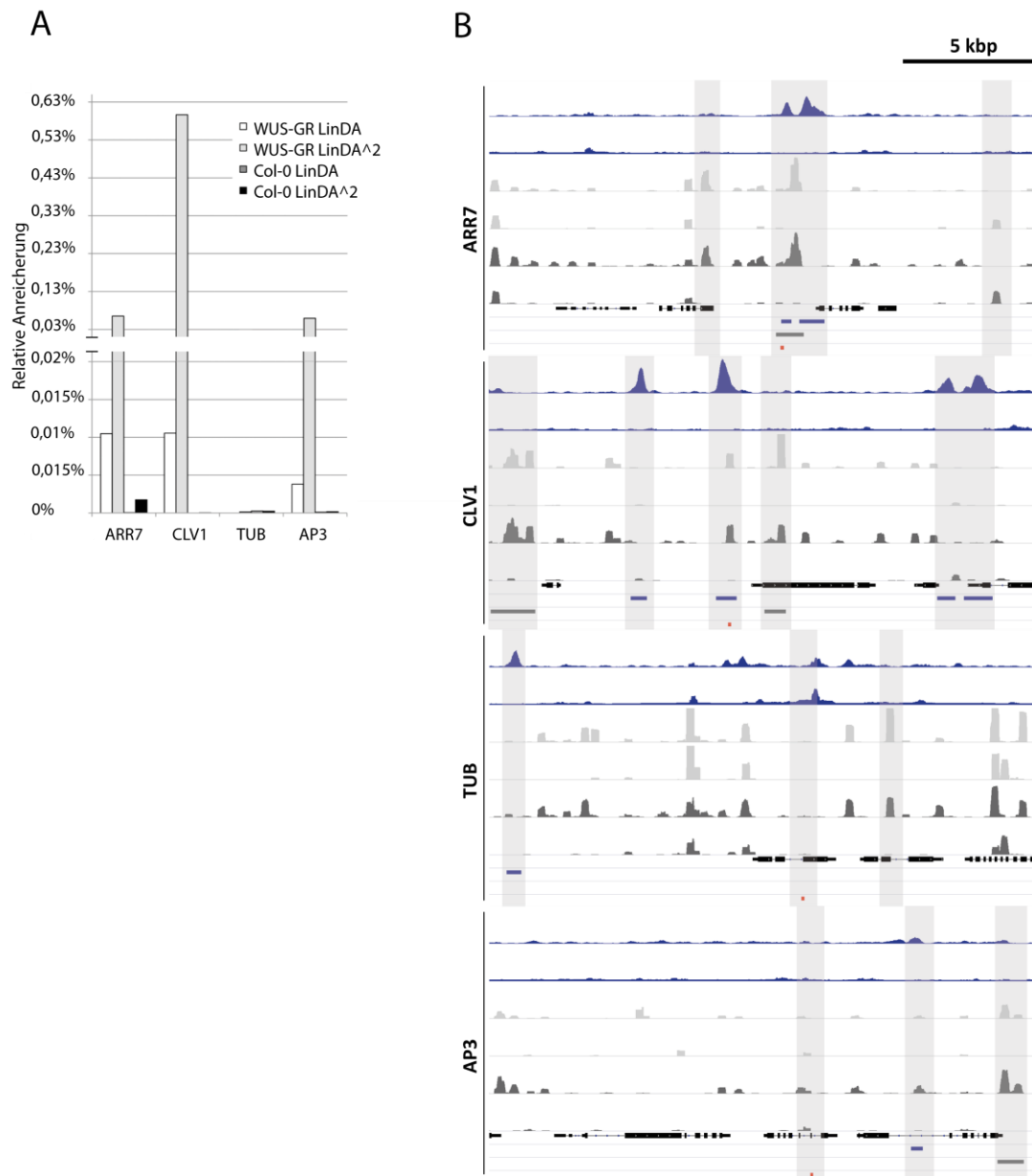
Obwohl Reporterlinien für die einzelnen Zellpopulationen vorlagen und die Isolation YFP-markierter Zellpopulationen durch FACS erfolgreich etabliert werden konnte, war der Anteil an Stammzellen und Zellen des OC zu gering, um sie optisch durch FACS aufreinigen zu können. Eine mögliche Lösung für dieses Problem könnte die neu entwickelte INTACT-Methode sein (Deal und Henikoff, 2011). Hier werden die Kernpopulationen über Markierungen der Kernhülle affinitäts-chromatografisch aufgereinigt. Dieser Ansatz wird aktuell im Labor verfolgt, ist aber nicht Teil dieser Arbeit.

#### **IV.1.4 Lineare Amplifikation von geringen DNA-Mengen für die Illumina-Sequenzierung**

Durch Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) werden nur die Bereiche des Chromatins aufgereinigt, die durch den entsprechenden Transkriptionsfaktor gebunden sind. Doch selbst diese Bereiche werden meistens nur in einer Größenordnung von Hundertstel Promille bis Hundertstel Prozent des Ausgangsmaterials zurück gewonnen. Zur Herstellung von Sequenzierbibliotheken für die Illumina-Sequenzierung ist jedoch eine kritische Menge an DNA erforderlich. Um sie zu erhalten kann entweder die Ausgangsmenge an Material für die ChIP erhöht, oder die resultierende Menge an DNA nach der ChIP amplifiziert werden. Da sich die Gewinnung von Zelltyp-spezifischem Chromatin für die ChIP als kritisch erwiesen hatte, wurde als Alternative die Amplifikation verfolgt.

Die lineare DNA Amplifikation (LinDA) beruht auf dem Prinzip der *in vitro* Transkription durch die T7 RNA-Polymerase. Durch das ligationsfreie Anbringen der T7-Promotersequenz am 5'-Ende jedes DNA-Fragments können diese gleichmäßig, ohne Einschränkung durch Fragmentlänge oder Basenzusammensetzung, transkribiert werden. Die Transkripte werden anschließend in cDNA übersetzt. Im Gegensatz zur PCR erfolgt die Amplifikation nicht exponentiell in Zyklen, sondern linear über den

gesamten Zeitraum der Reaktion. Dies ist notwendig, damit auch nach starker Vervielfältigung lokale Anreicherungen gegenüber dem Hintergrund proportional hervortreten.



**Abb. 4: Effekt von LinDA auf ChIP-Material.**

**A** Relative Anreicherung der verschiedenen Chromatin-Regionen nach ChIP gegen WUS und einer (LinDA) oder zwei (LinDA<sup>Δ2</sup>) Runden linearer DNA-Amplifikation. Mengen wurden gegen die Ausgangsmenge für die ChIP normalisiert. Skala komprimiert. WUS-GR: ChIP nach Induktion der WUS-GR Linie, Col-0: ChIP nach Induktion der Negativkontrolle Col-0. **B** ChIP-Seq Signal-Tracks (Behandlung oben, Kontrolle unten) und MACS2 annotierte Binderegionen für die verschiedenen Chromatin-Regionen; blau: ohne LinDA, hellgrau: nach zwei Runden LinDA, alle Duplikate behalten; dunkelgrau: nach zwei Runden LinDA, drei Duplikate behalten; schwarz: Gen-Modelle, rot: Bereich getestet in **A**. Interessante Bereiche mit gleichen oder abweichenden Signalen in den drei Bedingungen wurden grau unterlegt.

In einem Vorversuch wurde die Leistungsfähigkeit dieser Methode beim Amplifizieren von ChIP-Material getestet. Hierzu wurde Material aus einer ChIP mit AntiWUS Antikörper gegen DEX-induziertes Pflanzenmaterial der *WUS-GR* Linie (siehe folgender Abschnitt) und des Wildtyps einge-

setzt, das unterhalb der Detektionsgrenze der qPCR lag. Nach einer Runde LinDA waren die Positivkontrollen *CLV1* und *ARR7* im WUS-GR Experiment gegenüber den Negativkontrollen *TUB* und *AP3* angereichert (Abbildung 4). Die Kontrolllinie *Col-0* wies nachwievor kein detektierbares Signal auf. Mit einer weiteren Runde LinDA wurde getestet, in wie weit die Amplifikation linear erfolgt. Im *Col-0* Experiment konnten, mit Ausnahme eines schwachen Signals für *ARR7*, abermals keine Signale nachgewiesen werden. Im WUS-GR Experiment konnte eine deutliche Amplifikation der Signale nachgewiesen werden. Während jedoch *ARR7* nur um das etwa sechsfache vermehrt wurde, war das Signal für *CLV1* etwa 60-fach stärker. Ebenso war die Negativkontrolle *AP3* so stark vermehrt worden, dass ihr Signal vergleichbar war mit *ARR7*. Demnach erfolgte die Amplifikation nicht linear für alle Fragmente. Da die Analyse einer ChIP mit Hilfe der qPCR nur punktuelle Aussagen zulässt, wurde das amplifizierte Material Illumina-sequenziert, um ein globales Bild der ChIP nach LinDA zu erhalten (Abbildung 4). Die bioinformatische Analyse gestaltete sich schwierig, da der größte Teil der Sequenzen redundant und die Abdeckung des Genoms sehr gering war. So blieben nach Filtern auf maximal drei Duplikate pro Sequenz im WUS-GR Experiment noch etwa ein Drittel (4 630 495 aus 12 982 047) und im *Col-0* Experiment sogar nur ein Fünftel (1 099 948 aus 5 031 372) der Sequenzen übrig. Diese waren jedoch nicht gleichmäßig mit Anreicherungen an den WUS-Bindestellen, sondern als einzelne Stapel über das Genom verteilt. Die Identifikation von lokalen Anreicherungen gegenüber der Kontrolle war somit nur sehr schwer möglich. Die nicht-lineare Natur der Amplifikation führt zu ChIP-Seq Resultaten, die keine sichere Aussage über die eigentliche ChIP zulassen, da sowohl gebundene als auch Hintergrundfragmente willkürlich angereichert wurden. In dieser Form erscheint LinDA ungeeignet für die zuverlässige Amplifikation von ChIP-Material für die Genom-weite Identifikation von WUS-Bindestellen.

Nachdem sowohl die Amplifikation von ChIP-Material, als auch die Gewinnung von Zelltyp-spezifischem Chromatin für die Erstellung von Zelltyp-spezifischen WUS Bindeprofilen technisch nicht umzusetzen war, wurde dieser räumliche Ansatz zugunsten einer zeitlichen Auflösung der WUS Regulation, aufgegeben.

## **IV.2 Die *WUS-GR* Pflanzenlinie: ein Modell zur chemischen Induktion der WUS Funktion**

Da sich die Ausgangsmenge an Chromatin für die Analyse der WUS-Bindung als kritisch herausgestellt hatte, wurde als Alternative ein Ansatz gewählt, bei dem *WUS* in allen Zellen der Pflanze chemisch induziert werden konnte. Neben der Überwindung von technischen Einschränkungen konnten so die unmittelbaren Effekte von *WUS* und die Dynamik der Regulation untersucht werden. Gegenüber dem Fließgleichgewichtszustand in den Zellen mit endogener *WUS*-Expression können so transkriptionelle und epigenetische Veränderungen gemessen werden. Allerdings erfordert dieser Ansatz den Nachweis, dass sich diese Veränderungen so auch im Meristem abspielen können.



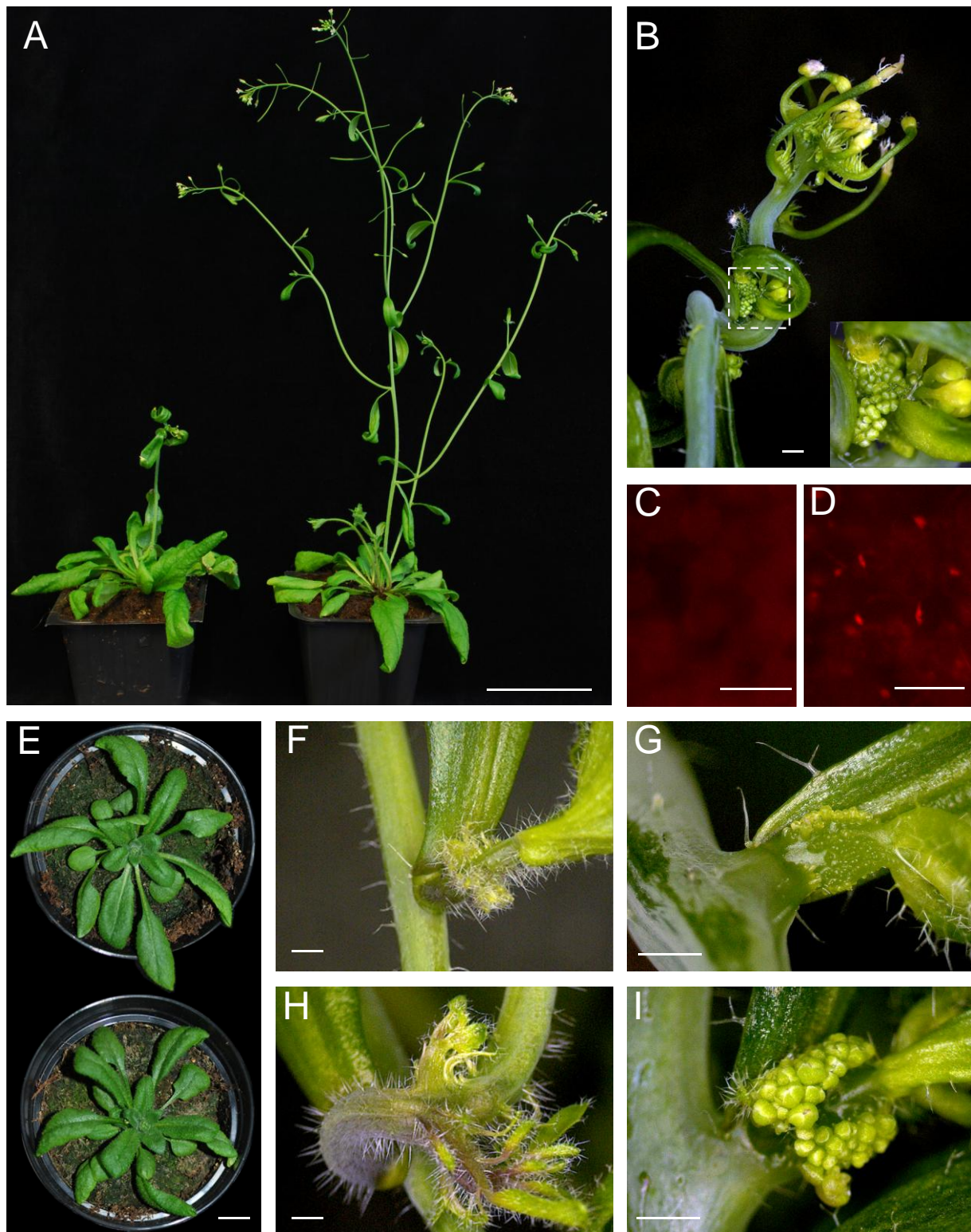
Als Modell für die WUS-Funktion diente die unlängst erstellte Pflanzenlinie *JF359-14*, in der der ubiquitär aktive Promoter des Gens *UBI10* eine translationale Fusion aus rot-fluoreszierendem *mCherry*, dem Glukokortikoid-Rezeptor (*GR*) und *WUS* kontrollierte (Utan, 2012). In dieser, als *WUS-GR* Linie bezeichneten, Pflanzenlinie liegt das Fusionsprotein in allen Zellen der Pflanze vor. Das Fusionsprotein wird durch die Bildung eines Komplexes mit Hitzeschockproteinen im Zytoplasma gehalten (Scherrer et al., 1993), bis die Bindung des synthetischen Steroids Dexamethason (DEX) an den Rezeptor den Komplex auflöst und es in den Nukleus transloziert (Tsai et al., 1994). Dieser Vorgang, der weniger als eine halbe Stunde benötigt (Utan, 2012), kann über den *mCherry*-Tag fluoreszenzmikroskopisch verfolgt werden (Abbildung 5C,D). Im Zellkern kann *WUS* nun seine Funktion ausüben.

Im Folgenden wird der Effekt von *WUS* auf den Phänotyp der Pflanzen der bisher nur grob beschrieben wurde (Utan, 2012) eingehender analysiert. Außerdem wird die *WUS-GR* Linie mit anderen Induktionssystemen und Transkriptionsfaktoren auf transkriptioneller Ebene verglichen, um die Wirksamkeit der induzierten *WUS*-Funktion abschätzen zu können.

#### **IV.2.1 Phänotypische und transkriptionelle Charakterisierung der *WUS-GR* Linie**

Uninduzierte Pflanzen der Linie *WUS-GR* sind vom Wildtyp *Col-0* phänotypisch nicht zu unterscheiden (Abbildung 5E). Wie bereits beschrieben führt die globale Induktion von *WUS* zur Hemmung der Entwicklung und schließlich zum Absterben der Pflanze (Utan, 2012).

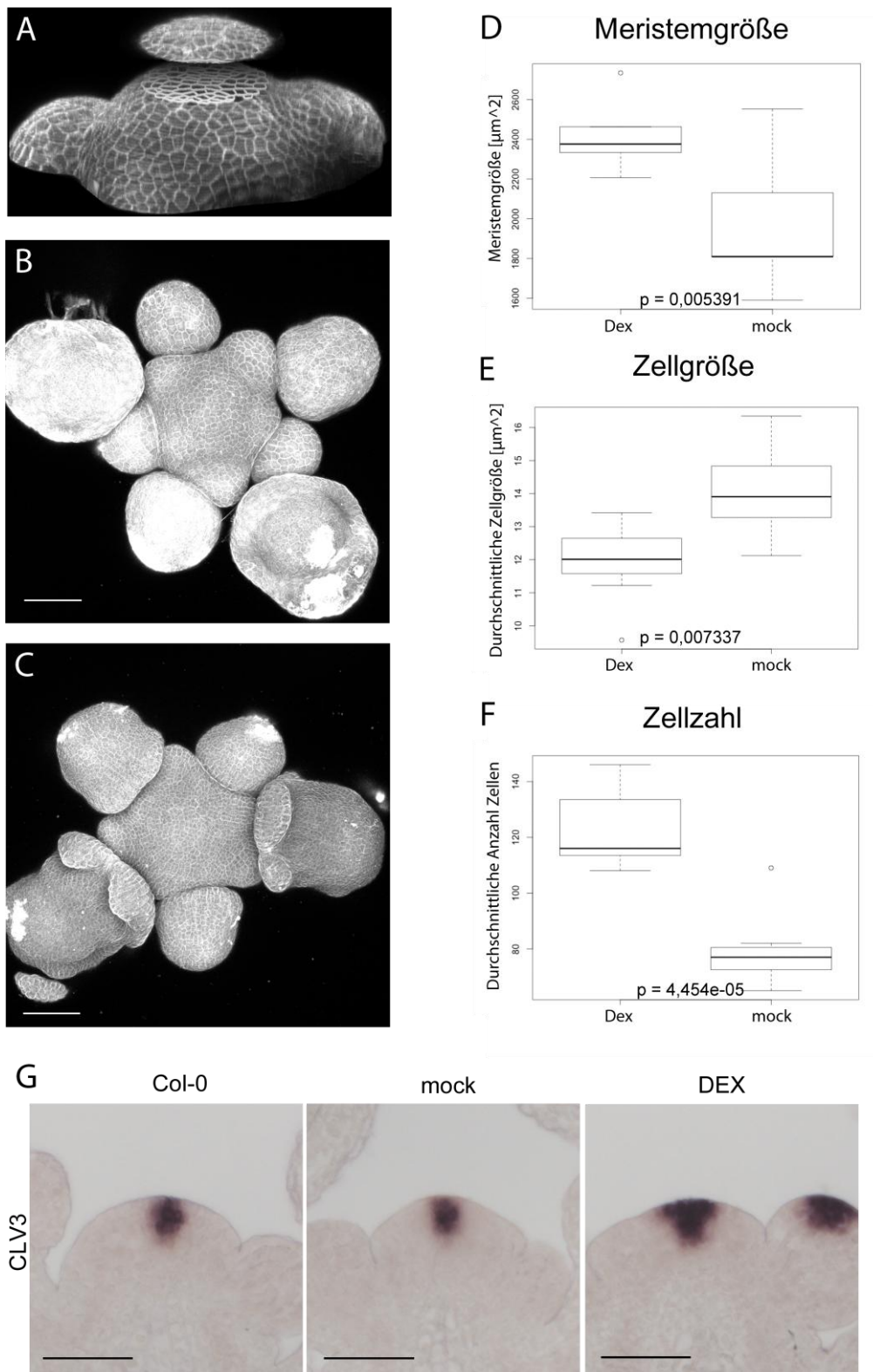
Bei lokaler Applikation auf den erst wenige Zentimeter großen Spross kam es zu einem charakteristischen Krümmen und Verdrehen des sich entwickelnden Sprosses und der stängelständigen Blätter (Abbildung 5B). Nach etwa zwei Wochen ließ sich entlang des jüngeren Teils des Sprosses eine Vielzahl neuer Meristeme erkennen, die sich, abhängig von der Position, zu Blättern und Blüten oder ganzen Blütenständen und Sprossachsen entwickelten (Abbildung 5B,F-I). Im Bereich des primären Blütenstands entstanden teilweise auch bartartige, unstrukturierte Fortsätze, deren Identität unklar ist. Offenbar war *WUS* in der Lage ektopisch eine Vielzahl neuer Meristeme zu induzieren. Die Position dieser neuen Meristeme war typischerweise nahe der Basis sekundärer Sprossachsen oder Blatt- und Blütenstiele. Während die Blüten des direkt behandelten Blütenstandes in ihrer Entwicklung arretierten, entwickelten sich die neu induzierten Blüten und Sprossachsen ebenso normal, wie im unbehandelten Teil der Pflanze.



**Abb. 5: Effekt der WUS-Induktion in der WUS-GR Linie.**

**A** einen Monat alte *WUS-GR* Pflanzen, zehn Tage nach lokaler Behandlung der Primärfloreszenz mit DEX (links) oder Mock (rechts); Maßstab: 5cm. **B** Primärfloreszenz und Spross aus **A** 16 Tage nach DEX-Behandlung; Maßstab: 1mm, Fokus: neu induziertes Infloreszenzmeristem. **C** und **D** mCherry-GR-WUS Proteinlokalisierung im Blattmesophyll **C** vor und **D** nach DEX-Induktion; Maßstab: 50µm. **E** unbehandelte *WUS-GR* (oben) und *Col-0* (unten) Pflanze bei Blühbeginn (Bilder neu angeordnet); Maßstab: 1cm. **F-I** neu induzierte vegetative (**F** und **H**) und reproduktive (**G** und **I**) Meristeme, 16 (**F** und **G**) und 22 Tage (**H** und **I**) nach lokaler DEX-Behandlung.

Ein deutlicher Effekt auf das apikale Sprossmeristem ließ sich bereits nach vier Tagen nachweisen. Schneidet man das Meristem optisch unmittelbar oberhalb des Übergangs von der Tunika in den Cortex, erhält man gegenüber der Kontrolle eine um fast 30% vergrößerte Schnittfläche, die proportional zur gesamten Meristemgröße ist (Abbildung 6A,D). Diese signifikante Vergrößerung des Meristems geht auf fast doppelt so viele, aber kleinere Zellen zurück (Abbildung 6E,F). Offenbar führt die Induktion von WUS zu einer erhöhten Zellteilungsrate im zentralen Bereich des Meristems. Zusätzlich lässt sich ein Abflachen des Meristems erkennen, wodurch die Übergangsregion zu den Blütenprimordien weniger deutlich wird, und einzelne junge Blüten Deformationen zeigen (Abbildung 6B,C).



**Abb. 6: Effekt der WUS-Induktion auf das SAM.**

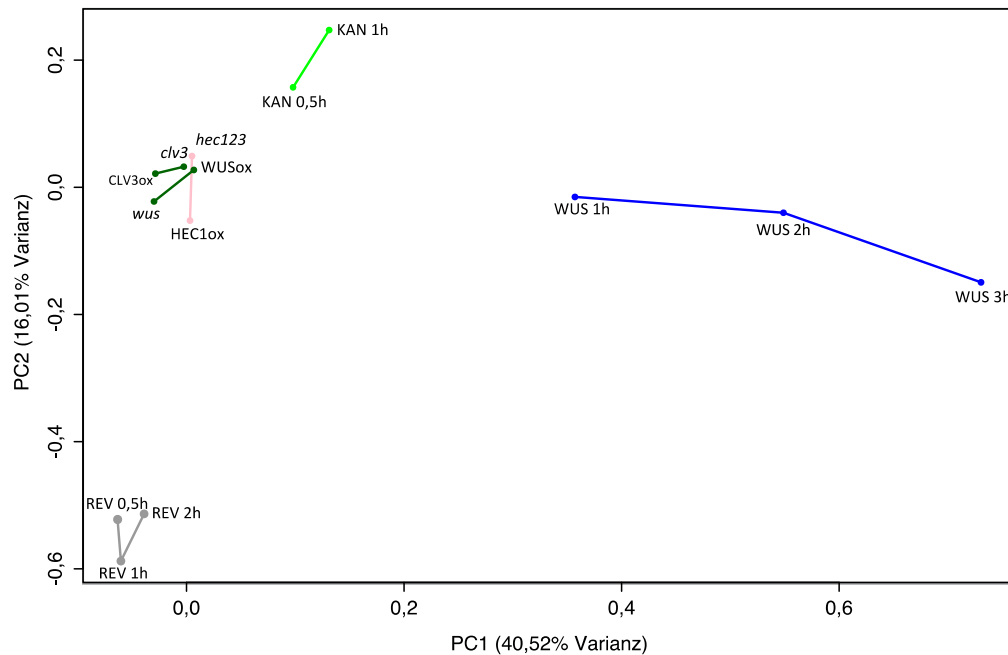
**A** Visualisierung der Methode zur Bestimmung der Meristemgröße, Zellgröße und Zellzahl. **B** Kontrollmeristem und **C** Meristem vier Tage nach WUS-Induktion; Maßstab: 50µm. **D** Meristemgröße (Fläche des Meristemschnitts), **E** Zellgröße (Fläche) und **F** Zellzahl als Durchschnitt der einzelnen Meristeme, vier Tage nach WUS-Induktion (DEX) und in der Kontrolle (mock); n= 7 und 8. **G** *In situ* Hybridisierung mit *CLV3*-Sonde auf Wildtyp (Col-0) mit DEX und WUS-GR mit Mock- und DEX-Behandlung zwei Tage nach Behandlung, Maßstab: 50µm.

*In situ* Hybridisierung und Bilder von Frau Dr. Anna Medzihradszky.

Nach bereits 24 Stunden ließ sich eine deutliche Zunahme der Expression des Stammzellmarkers *CLV3* und eine Vergrößerung seiner Expressionsdomäne nachweisen (Abbildung 6G). Die Vermutung liegt nahe, dass die Meristemvergrößerung durch die WUS-induzierte Vergrößerung der Stammzellpopulation hervorgerufen wird. Interessanterweise blieben die Stammzellen jedoch weiterhin auf den zentralen Bereich des Meristems beschränkt. Die WUS-Aktivität reichte nicht aus, um weitere Bereiche des Meristems in Stammzellen dedifferenzieren zu lassen.

Neben den morphologischen Veränderungen hat die WUS-Induktion auch einen deutlichen Einfluss auf das Transkriptom (Utan, 2012). Um die Genexpressionsveränderungen in dieser Linie mit anderen Modellsystemen vergleichen zu können, wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Verglichen wurden die normalisierten Expressionsveränderungen aus verschiedenen Microarray Experimenten. Als Vergleich dienten publizierte Datensätze der beiden Transkriptionsfaktoren KAN und REVOLUTA (REV) (Reinhart et al., 2013), die ebenfalls im gesamten Keimling mit Hilfe des Glukokortikoidsystems induziert wurden, der Meristemmutanten *clv3*, *wus* und *hec1/hec2/hec3*, sowie deren Überexpressionen (Busch et al., 2010; Schuster et al., 2014), die auf einem Ethanol induzierbaren System (AlcA) basieren (Roslan et al., 2001). Obwohl die ersten beiden Hauptkomponenten lediglich 56,53% der Gesamtvarianz abbilden können, zeichnet sich ein deutliches Bild ab (Abbildung 7). Die erste Hauptkomponente (PC1) wird hauptsächlich durch die drei Experimente der Zeitreihe mit der *WUS-GR* Linie definiert. Die zweite Hauptkomponente (PC2) ergibt sich aus den Effekten der Induktion von KAN und dem Antagonisten REV. Die Mutanten und die auf dem Ethanolssystem basierenden Überexpressionen bilden eine Gruppe nahe dem Ursprung des Plots. Die einzelnen Experimente gruppieren sich dabei wie zu erwarten. Die konstitutive *WUS* Überexpression (*clv3*-Mutante) und die Ethanol induzierte Überexpression liegen nahe zusammen mit höheren Werten für die erste Hauptkomponente als die konstitutive *wus*-Mutante und die Ethanol-induzierbare *CLV3* Überexpression. Die beiden *HEC*-Experimente sind klar entlang der zweiten Hauptkomponente voneinander getrennt.

Insgesamt zeigt sich, dass die auf dem GR-System basierenden Überexpressionen deutlich stärkere Expressionsveränderungen hervorrufen als jene, die das AlcA-System nutzen. Die hier vorgestellte *WUS-GR* Line dürfte daher besser geeignet sein WUS-regulierte Gene zu analysieren als frühere Ansätze (Busch et al., 2010; Leibfried et al., 2005).



**Abb. 7: Hauptkomponentenanalyse verschiedener Meristemregulatoren.**

Microarray Datensätze aus Busch et al., 2010 (*clv3*, *CLV3ox*, *wus*, *WUSox*); Reinhart et al., 2013 (*KAN*, *REV*); Schuster et al., 2014 (*hec1,2,3* und *HEC1ox*) und Utan, 2012 (*WUS*) wurden neu analysiert und alle Expressionsveränderungen gegenüber der jeweiligen Kontrolle für die Hauptkomponentenanalyse eingesetzt. *WUS* 1h-*WUS* 3h (blau); *KAN* 0,5h und *KAN* 1h (grün); *REV* 0,5-*REV* 2h (grau): Gesamte Keimlinge nach ektopischer Überexpression des jeweiligen Faktors durch DEX-Behandlung für den angegebenen Zeitraum. *HEC1ox* und *hec1,2,3* (pink): Gewebe nach 16h ektopischer Überexpression durch Ethanol Dampf (*HEC1ox*) und aus konstitutiver Dreifachmutante. *CLV3ox*, *clv3*, *WUSox*, *wus* (dunkelgrün): präparierte Meristeme nach Ethanol induzierter *WUS*-Überexpression (*WUSox*) und konstitutiver Repression (*wus*), und Ethanol induzierter *WUS*-Repression (*CLV3ox*) und konstitutiver Überexpression (*clv3*).

In der hier vorgestellte *WUS-GR* Pflanzenlinie lässt sich die *WUS*-Aktivität innerhalb weniger Stunden ubiquitär in der Pflanze chemisch induzieren (Abbildung 5). Sie führt zu deutlicheren Expressionsveränderungen als in früheren Modellsystemen (Abbildung 7). Während die Pflanzen vor der Induktion keine vom Wildtyp abweichenden Phänotypen aufweisen (Abbildung 5) und die Expression des Stammzellmarkers *CLV3* unverändert ist (Abbildung 6), führt die Induktion zu einer Zunahme seiner Expression, die mit einer Vergrößerung des apikalen Sprossmeristems, wahrscheinlich durch verstärkte Zellproliferation, einher geht (Abbildung 6). Darüber hinaus kommt es zu morphologischen Veränderungen des Sprosses und der Blätter, die ebenfalls auf eine veränderte Zellproliferation hinweisen könnten, und einer massiven ektopischen Induktion von neuen Meristemen (Abbildung 5). Die beschriebenen phänotypischen und transkriptionellen Veränderungen passen zur Funktion von *WUS* als positivem Regulator der Stammzellfunktion. Daher bietet sich die *WUS-GR* Linie als Modell zur detaillierten Untersuchung der *WUS*-abhängigen Prozesse in der Stammzellregulation an.

### IV.3 Analyse des molekularen Mechanismus der Genregulation durch WUS

Aufgabe dieser Arbeit war es zunächst den molekularen Mechanismus der Genregulation durch WUS aufzuklären. Als Transkriptionsfaktor bindet WUS spezifische Bereiche im Promoter seiner Zielgene. Diese Bindung muss spezifisch erfolgen und kann zu einer Veränderung der Transkriptionsrate des Zielgens führen. Im Folgenden wird daher untersucht, wo das WUS-Protein im Genom bindet und welches DNA-Motiv dabei gebunden wird, welche Gene durch WUS direkt reguliert werden und welche Veränderungen auf epigenetischer Ebene diese Regulation erklären können.

#### IV.3.1 Auffinden und Charakterisierung der WUS-Bindestellen im Genom

Mit Hilfe der Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) lassen sich die Bereiche des Chromatins bestimmen, die durch einen spezifischen Faktor gebunden werden. Die Interaktion des Faktors mit der DNA wird chemisch fixiert, das Chromatin fragmentiert und jene Fragmente, die an den Faktor gebunden waren, immunopräzipitiert. Für ein genomweites Bild dieser Interaktion kann das resultierende DNA-Material sequenziert werden (ChIP-Seq). Nach der bioinformatischen Kartierung der *Reads* (Einzelsequenzen), ergeben sich lokale Gruppierungen in Form von *Peaks* (spitzen Anhäufungen) an jenen Stellen im Genom, die aufgrund der Interaktion mit dem Faktor immunopräzipitiert wurden. Diese Bereiche können dann weiter auf spezifischen Informationsgehalt für die Bindung oder die Genregulation hin analysiert werden.

Zur Identifikation der WUS-Bindestellen wurden zwei biologische Replikate, bestehend aus jeweils sechs bis neun technischen Replikaten, einer ChIP-Seq mit RFP-*Trap* Antikörper auf fünf bis sieben Tage alte Keimlinge der *WUS-GR*-Linie, erzeugt. Dafür wurden Keimlinge zwei Stunden nach globaler WUS-Induktion verwendet. Als Kontrolle diente jeweils der Wildtyp *Col-0* bei gleicher Behandlung. Tabellen 3 und 4 listen die Ergebnisse der *Read*-Kartierung und Bindestellen-Identifizierung auf.



**Tabelle 3: Übersicht der Sequenz-Kartierungen durch Bowtie2**

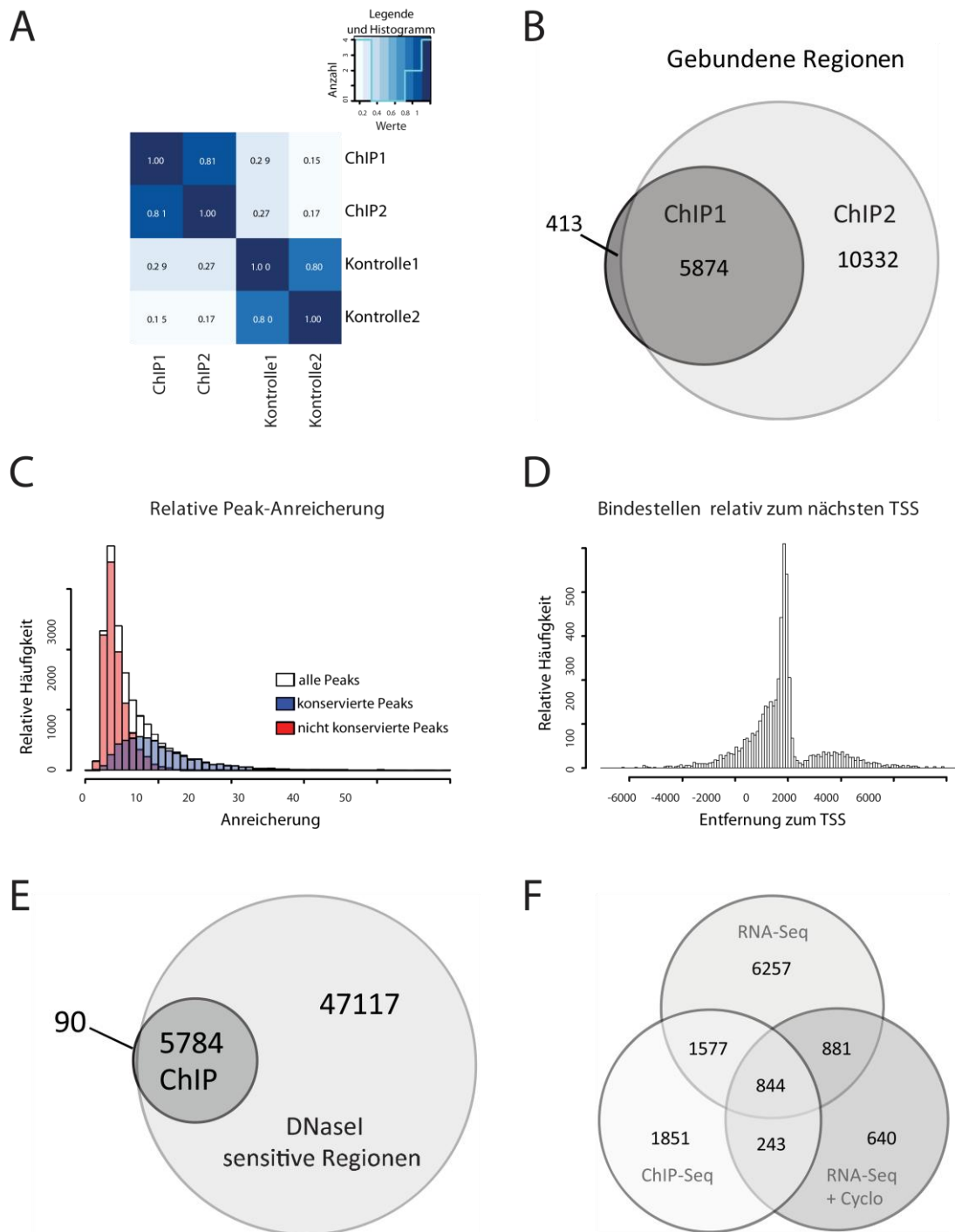
Datum	Rohdaten	Output	Gesamtzahl Reads	Übereinstimmungen			Gesamtrate
				keine	genau 1	>1	
16. Mai 09	C22ULACXX_Col_O_H3K9ac_13s003404-1-1_lbberson_lane813s003404_sequence.txt	Col-0_H3K9_14ac_bowtie2_1.sam	27821132 (100,00%)	13636115 (49,01%)	12120332 (43,57%)	2064685 (7,42%)	50,99%
16. Mai 09	C22ULACXX_Col_O_H3K27me3_13s003406-1-1_lbberson_lane813s003406_sequence.txt	Col-0_H3K27me3_bowtie2_1.sam	30427738 (100,00%)	13667774 (44,92%)	13106076 (43,07%)	3653888 (12,01%)	55,08%
16. Mai 09	C22ULACXX_WUS_GR_H3K9ac_13s003405-1-1_lbberson_lane813s003405_sequence.txt	WUS-GR_H3K9_14ac_bowtie2_1.sam	33117916 (100,00%)	14091872 (42,55%)	16190318 (48,89%)	2835726 (8,56%)	57,45%
16. Mai 09	C22ULACXX_WUS_GR_H3K27me3_13s003407-1-1_lbberson_lane813s003407_sequence.txt	WUS-GR_H3K27me3_bowtie2_1.sam	33693097 (100,00%)	22237084 (66,00%)	9025177 (26,79%)	2430836 (7,21%)	34,00%
16. Mai 09	C22ULACXX_WUS_GR_RFP_13s003403-1-1_lbberson_lane813s003403_sequence.txt	WUS-GR_RFP_bowtie2_1.sam	34325709 (100,00%)	23279697 (67,82%)	7228411 (21,06%)	3817601 (11,12%)	32,18%
16. Mai 09	000000000-A4DA5_Col_O_RFP_13s004409-1-1_lbberson_lane113s004409_sequence.txt	Col-0_RFP_re_bowtie2_1.sam	15286037 (100,00%)	12484458 (81,67%)	1618407 (10,59%)	1183172 (7,74%)	18,33%
13. Aug 09	D2F2FACXX_C_Ac_13s005442-1-1_lbberson_lane713s005442_sequence.txt	Col-0_H3K9_14ac.sam	13102823 (100,00%)	6309869 (48,16%)	5452135 (41,61%)	1340819 (10,23%)	51,84%
13. Aug 09	D2F2FACXX_C_Meth_13s005444-1-1_lbberson_lane713s005444_sequence.txt	Col-0_H3K27me3.sam	21708921 (100,00%)	12746488 (58,72%)	6646196 (30,62%)	2316237 (10,67%)	41,28%
13. Aug 09	D2F2FACXX_C_RFP_13s005440-1-1_lbberson_lane713s005440_sequence.txt	Col-0_RFP-Trap.sam	22544513 (100,00%)	12248504 (54,33%)	5919394 (26,26%)	4376615 (19,41%)	45,67%
13. Aug 09	D2F2FACXX_W_Ac_13s005441-1-1_lbberson_lane713s005441_sequence.txt	WUS-GR_H3K9_14ac.sam	27905771 (100,00%)	11218228 (40,20%)	13507158 (48,40%)	3180385 (11,40%)	59,80%
13. Aug 09	D2F2FACXX_W_Meth_13s005443-1-1_lbberson_lane713s005443_sequence.txt	WUS-GR_H3K27me3.sam	25175120 (100,00%)	14246238 (56,59%)	7754750 (30,80%)	3174132 (12,61%)	43,41%
13. Aug 09	D2F2FACXX_W_RFP_13s005439-1-1_lbberson_lane713s005439_sequence.txt	WUS-GR_RFP-Trap.sam	25929753 (100,00%)	10554109 (40,70%)	9756768 (37,63%)	5618876 (21,67%)	59,30%
13. Nov 09	C2LVTACXX_bpc123_ChiP1_13s007015-1-1_lbberson_lane813s007015_sequence.txt	bpc123.sam	61730882 (100,00%)	25870848 (41,91%)	19151692 (31,02%)	16708342 (27,07%)	58,09%
13. Nov 09	C2LVTACXX_Col_0_ChiP1_13s007014-1-1_lbberson_lane813s007014_sequence.txt	Col-0.sam	67577637 (100,00%)	24324692 (36,00%)	22079079 (32,67%)	21173866 (31,33%)	64,00%
13. Nov 09	C2LVTACXX_WUS_GR_ChiP1_13s007013-1-1_lbberson_lane813s007013_sequence.txt	WUS-GR.sam	58630610 (100,00%)	21206207 (36,17%)	15727652 (26,82%)	21696751 (37,01%)	63,83%

**Tabelle 4: Übersicht der Bindestellen-Identifizierung durch MACS2**

Datum	Behandlung	Kontrolle	Output	Peaks
20. Jun 13	WUS-GR_RFP_bowtie2_1.sam	Col-0_RFP_re_bowtie2_1.sam	WUS-GR_ChiP_MACS2	6287
20. Jun 13	Col-0_H3K9_14ac_bowtie2_1.sam	WUS-GR_H3K9_14ac_bowtie2_1.sam	Col-0_H3K9_14ac_new	9556
20. Jun 13	WUS-GR_H3K9_14ac_bowtie2_1.sam	Col-0_H3K9_14ac_bowtie2_1.sam	WUS-GR_H3K9_14ac_new	3935
20. Jun 13	WUS-GR_H3K27me3_bowtie2_1.sam	Col-0_H3K27me3_bowtie2_1.sam	WUS-GR_H3K27me3_new	3775
14. Aug 13	WUS-GR_RFP-Trap.sam	Col-0_RFP-Trap.sam	WUS-GR_ChiP_MACS2_1	16206
14. Aug 13	Col-0_H3K9_14ac.sam	WUS-GR_H3K9_14ac.sam	WUS-GR_deacetylated	15596
14. Aug 13	WUS-GR_H3K9_14ac.sam	Col-0_H3K9_14ac.sam	WUS-GR_acetylated	4471
14. Aug 13	WUS-GR_H3K27me3.sam	Col-0_H3K27me3.sam	WUS-GR_H3K27me3	1586
14. Nov 13	bpc123.sam		bpc123_MACS2	57747
14. Nov 13	WUS-GR.sam	bpc123.sam	WUS-GR_MACS2	28638
14. Nov 13	Col-0.sam	bpc123.sam	Col-0_MACS2	21662

Die beiden Replikate weisen jeweils eine hohe genomweite Korrelation auf (Abbildung 8A) und konnten verwendet werden, um die WUS-Bindestellen zu identifizieren. Der große Unterschied in der Anzahl der identifizierten Stellen, mit 6287 in der ersten WUS ChIP-Seq gegenüber 16206 in der Zweiten, beruht auf der unterschiedlichen Sequenziertiefe der Kontrollen. Nachdem für die Kontrolle der WUS ChIP-Seq 1 nur etwa 20% der Reads der entsprechenden Kontrolle der WUS ChIP-Seq 2 verfügbar waren, erreichten offenbar viele kleine *Peaks* nicht das nötige Signifikanzniveau, um als Bindestelle identifiziert zu werden. Allerdings wurden 5874 (93%) Stellen, als Überlappung von mindestens 10bp (6201 (98%) bei 1bp Überlapp) in beiden Replikaten unabhängig identifiziert (Abbildung 8B). Da es sich bei diesen konservierten *Peaks* um jene mit der größten Anreicherung (*Peak*-Höhe) gegenüber dem Hintergrund (Abbildung 8C) und somit auch der größten Signifikanz (keine Abbildung) in der WUS ChIP-Seq 2 handelte, wurden diese Bereich als echte WUS-Bindestellen für die weitere Analyse herangezogen.



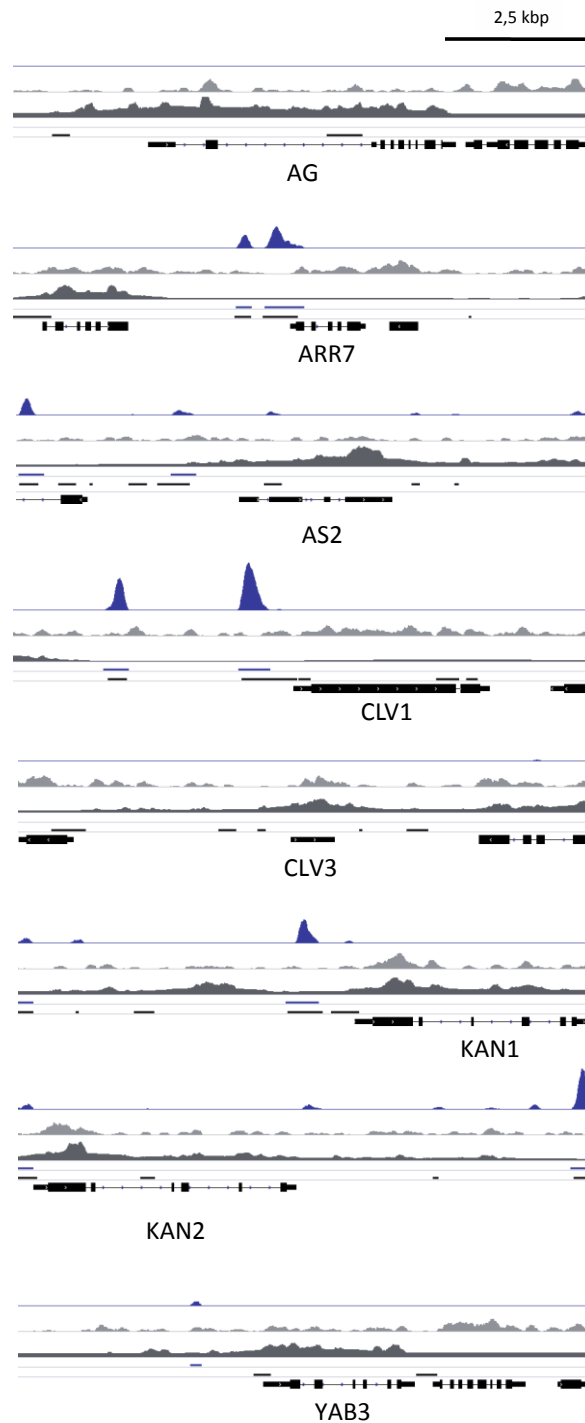


**Abb. 8: Übersicht des WUS-GR ChIP-Seq Experiments.**

**A** Korrelation der einzelnen Signaltracks (BEDGRAPH) der beiden WUS-GR ChIP-Seqs (ChIP1 und ChIP2) und der jeweiligen Col-0 ChIP-Seq Kontrollen (Kontrolle1 und Kontrolle2). Kartierungsartefakte (Regionen >100 Reads) wurden maskiert. **B** Venn-Diagramm der in den beiden unabhängigen WUS-GR ChIP-Seq Experimenten identifizierten Binderegionen auf genomischer Ebene (Überlappung der Regionen von min. 10bp zwischen den Experimenten). **C** Histogramm der relativen Peak Anreicherungen (Peak-Höhe) in allen und in den konservierten (in beiden Experimenten unabhängig identifiziert) und nicht konservierten Peaks. **D** Histogramm der Entfernungen der konservierten Binderegionen zum nächsten Transkriptionsstart (TSS) als Grundlage der Annotation von gebundenen Genen. **E** Venn-Diagramm der konservierten Bindestellen (ChIP) und Regionen offenen Chromatins im Keimling, zugänglich für den Verdau mit DNaseI (DNaseI sensitive Regionen). **F** Venn-Diagramm der durch WUS gebundenen Gene (ChIP-Seq) und der durch WUS direkt (RNA-Seq + Cyclo) oder allgemein (RNA-Seq) regulierten Gene ( $p_{adj} < 0,05$ ).

Die so identifizierten WUS-Bindestellen befinden sich fast ausschließlich (98%) in Bereichen offenen Chromatins (Abbildung 8D) in einer Region sehr nahe des Transkriptionsstarts (Abbildung 8E). Daher erfolgte die Annotation der dazugehörigen Gene anhand der größten räumlichen Nähe zur Bindestelle. Die so identifizierten 4515 WUS-gebundenen Gene korrelieren sehr gut mit WUS-abhängig regulierten Genen (Abbildung 8F).

Auch die Bindestellen von vielen bekannten WUS-Zielgenen, wie *ARR7*, *CLV1*, *KAN1*, *KAN2*, *AS2* und *YAB3* (Leibfried et al 2005, Busch et al., 2010; Yadav et al., 2013), ließen sich in diesem Datensatz deutlich erkennen (Abbildung 9). Das Fehlen einer erkennbaren Bindung im Promoterbereich von *AGAMOUS* und *CLV3* dürfte an dem verwendeten Entwicklungsstadium und Gewebe (ganze Keimlinge) liegen (Lohmann et al., 2001, Yadav et al., 2011). Beide Loci wiesen starke Signale für H3K27me3 und damit Markierungen für eine epigenetische Repression im Keimling auf.








**Abb. 9: WUS-Bindungen in bekannten WUS-Zielgenen.**

Darstellung der ChIP-Seq Signal-Tracks und identifizierter Bindestellen in genomischen Regionen nahe bekannter, direkter WUS-Zielgene. ChIP-Seq Tracks: WUS (blau); Histon 3 (hellgrau); H3K27me3 Modifikationen (dunkelgrau). Regionen: WUS-Bindestellen (blau); offenes Chromatin (schwarz). Gen-Model in schwarz, 5'-3'-Orientierung von links nach rechts.

#### IV.3.2 Genomweite Identifikation von WUS-Zielgenen

Wie im vorangegangenen Abschnitt dargelegt, bestätigen die Kontrollen die Qualität des neu erzeugten WUS ChIP-Seq Datensatzes. Die deutlich höhere Auflösung der Binderegionen in diesem

Datensatz (*Peak*-Breite: Durchschnitt 500bp, Standardabweichung 243bp, min. 161bp, max. 2203bp), gegenüber früheren ChIP-chip Daten (Busch et al., 2010), ermöglichte die eingehendere Untersuchung der gebundenen Sequenzen. Die bioinformatische Suche nach überrepräsentierten Sequenzmotiven ergab gleichbleibende Resultate, unabhängig davon, ob alle oder nur eine Auswahl an Binderegionen dafür verwendet wurden (Abbildung 10). Weder die *Peak*-Höhe, und damit mutmaßlich die Bindestärke, noch die Regulation der korrespondierenden Gene konnte durch unterschiedliche Bindemotive erklärt werden. Auch die angrenzenden Sequenzen wiesen keine Muster auf. Insgesamt vier unterschiedliche Motive waren in den WUS-gebundenen Regionen deutlich angereichert, aber keines davon in jedem *Peak* vorhanden.

	E-value	Anzahl im Genom	Anzahl in Peaks	Peaks mit Motiv
	1,8e-070	114088	8466	3456 (58,84%)
	2,2e-008	32657	1559	1304 (22,20%)
		146745	10025	3964 ( <b>67,48%</b> )
	1,5e-066	120114	8770	3639 ( <b>61,95%</b> )
	1,0e-041	361060	14224	4869 ( <b>82,89%</b> )
	2,3e-019	321107	12195	4696 ( <b>79,95%</b> )

**Abb. 10: Überrepräsentierte Sequenz-Motive in WUS-Bindestellen.**

Auflistung der durch MEME-Suite identifizierten Motive in Bereichen 200bp um die Zentren der Top-Peaks (Peak-Score >45). Darstellung der Positions-Gewichts-Matrix der Motive, statistischer Erwartungswert (E-value) mit Angabe der Gesamtzahl des jeweiligen Motivs im Genom und in Peaks, sowie Anteil der Peaks mit mindestens einer Instanz.

Die Basenabfolge CA[C/T]G[C/T]G konnte in 58,8% aller *Peaks* nachgewiesen werden. Dieses Motiv ähnelt stark der G-Box (CACGTG), die bereits als WUS-Bindemotiv bestätigt wurde (Busch et al., 2010). Als Variante dieses Motivs wurde zusätzlich die Sequenz CAAG[G/T]G in 22,2% aller *Peaks* gefunden, die zwar kein Palindrom darstellt, aber ebenso aus zwei invertierten Tripletts besteht. Zumindest eine der beiden Varianten konnte in 67,5% aller Bindestellen nachgewiesen werden.

Auch das Motiv GG[ACT]CC und längere Abfolgen aus GAGA, bzw. TATA waren deutlich angereichert. Während das erste Motiv dem zentralen Bereich der Bindesequenz der pflanzenspezifischen TCP-Transkriptionsfaktoren entspricht (Kosugi und Ohashi, 2002), kann die GAGA-Sequenz von BPC-Transkriptionsfaktoren gebunden werden (Wanke et al., 2011). Bei dem TATA-Motiv könnte es sich um die TATA-Box nahe dem Transkriptionsstart handeln, was durch die Präferenz der WUS-

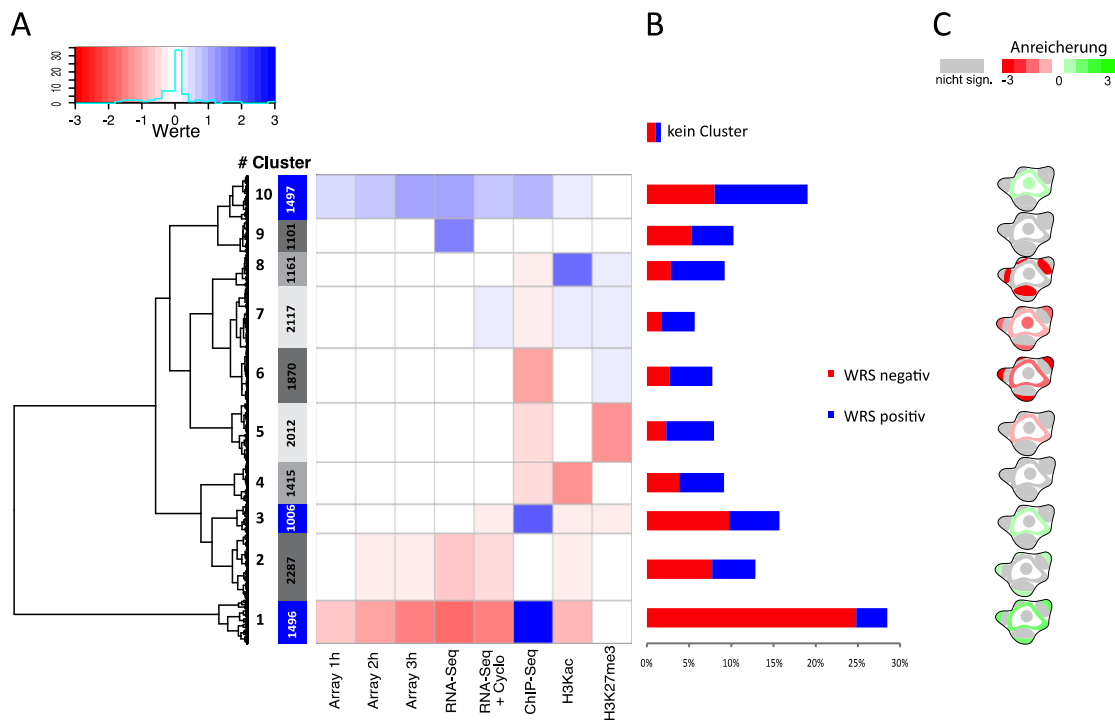
Bindung in diesem Bereich erklärt werden könnte (Abbildung 8E). Die Sequenz des zweiten bekannten WUS-Bindemotivs TTAAT[C/G] [C/G] aus *AGAMOUS* (Lohmann et al., 2001) weicht deutlich davon ab und konnte nicht als angereichertes Motiv identifiziert werden.

Für die weitere Analyse der WUS-Funktion war es wichtig, die durch die Bindung direkt regulierten WUS-Zielgene zu identifizieren. In einem früheren Experiment wurden hierzu die transkriptionellen Veränderungen nach WUS-Induktion in Gegenwart des Translationsinhibitors Cycloheximid aufgenommen (Utan, 2012). Die Behandlung mit Cycloheximid stellt sicher, dass nur die unmittelbar durch WUS ausgelösten Expressionsänderungen detektiert werden. Auf diese Weise konnten 2608 direkt signifikant regulierte Gene identifiziert werden (Abbildung 8F). Diese Methode hat jedoch den Nachteil, dass direkte WUS-Effekte, die von der Gegenwart kurzlebiger Co-Faktoren abhängen, nicht auftreten können. Ebenso ist es möglich, dass Zelltyp-spezifische Effekte, die sonst nur als schwache Regulation sichtbar würden, durch den wesentlich stärkeren globalen Effekt von Cycloheximid maskiert werden. So wurde der bekannte repressive Effekt von WUS auf *CLV1* (Busch et al., 2010) nicht als signifikant eingestuft. Eine vollständige Liste aller WUS-Zielgene lässt sich mit dieser Methode daher nicht erzeugen.

Ähnlich verhält es sich jedoch auch mit den durch ChIP-Seq identifizierten Zielgenen. Es ist möglich, dass schwache lokale *Read*-Anhäufungen nicht das nötige Signifikanzniveau erreichen, um als *Peak* identifiziert zu werden. Derartige Bindungen würden bei strikten Filterbedingungen übersehen werden. Andererseits ergänzen sich die beiden Ansätze, da jeweils Gene identifiziert werden, die zwar durch WUS gebunden, nicht aber reguliert, bzw. reguliert aber nicht gebunden erscheinen. Zu den 1087 durch WUS gebunden und regulierten Zielgenen kämen so noch weitere 1521 direkt regulierte und 3428 gebundene mutmaßliche Zielgene hinzu (Abbildung 8F). Bei einer Anpassung der Signifikanzbedingungen für jedes der beiden Experimente ändert sich die Anzahl an gemeinsam identifizierten Zielgenen jedoch beträchtlich. Welcher Schwellenwert sollte demnach für die Identifikation von Bindestellen und direkt regulierten Genen gewählt werden?

In dieser Arbeit wurde ein Ansatz gewählt, der auf willkürliche Schwellenwerte verzichtet. Stattdessen erfolgte die Identifikation der WUS-Zielgene durch eine Metanalyse mit hierarchischer Clusterbildung. Dabei wurden die normalisierten Expressionsveränderungen jedes Gens aus der Microarray-Zeitreihe der Masterarbeit von Gözde Utan (2012) und den RNA-Seq Experimenten mit den ChIP-Seq Experimenten kombiniert. Hierzu wurde die durchschnittliche, normalisierte Anzahl an *Reads* im Promoter- und Terminatorbereich jedes Gens erhoben. Dieser Ansatz ist unabhängig von der bioinformatischen Identifikation von *Peaks* und ergibt Werte für jedes einzelne Gen. Dabei ist unerheblich, ob ein Promoter viele kleine oder einen einzelnen großen *Peak* aufweist. So konnten insgesamt 15 962 Gene aufgrund ihrer kombinierten Expressions- und Bindemuster in zehn verschiedene Cluster unterteilt werden. Diese Form der Analyse trägt dem oben genannten Problem Rechnung. Sollte aus technischen Gründen für ein WUS-Zielgen keine Bindung detektiert worden

sein, das Expressionsmuster dem anderer WUS-Zielgene aber entsprechen, so wird es dennoch dem selben Cluster wie die anderen WUS-Zielgene zugeordnet. Die Darstellung dieser Clusteranalyse erfolgte in Form einer *heatmap* (Abbildung 11A, Abbildung Anhang 1). Genau drei Cluster zeichnen sich durch deutlich erhöhte WUS-Bindung im Promoterbereich aus.



**Abb. 11: Metaanalyse zur Identifikation der WUS-Zielgene.**

**A** Heatmap einer hierarchischen Clusteranalyse der Veränderungen im Transkriptom und Epigenom nach WUS-Induktion. Dargestellt ist der Durchschnittswert des jeweiligen Clusters. Die Anzahl der Gene im Cluster ist angegeben. Blau markierte Cluster repräsentieren direkte WUS-Zielgene. Array 1h-3h, RNA-Seq und RNA-Seq + Cyclo: Expressionsveränderungen (log2) im jeweiligen Experiment. ChIP-Seq: normalisierte Anzahl an Tags pro Base im Promoterbereich für WUS-GR. H3ac: normalisierte Anzahl an Tags pro Base über das Gen für Histon 3 Acetylierung. H3K27me3: normalisierte Anzahl an Tags pro Base über das Gen für Histon 3 Lysin 27 Dreifachmethylierung. **B** Anteil der Gene im Cluster mit WUS-Regulationscore (WRS) und Regulationsrichtung (aus Busch et al., 2010). **C** Kartierung der Expressionsdomänen der Gene des Clusters im SAM (nach Yadav et al., 2014). Signifikant über- oder unterrepräsentierte Gewebe sind farbig markiert.

Das Cluster 1 (Nummerierung von unten) besteht aus 1496 Genen, die eine erkennbare und zunehmende Repression in der Zeitreihe und eine starke Repression in den RNA-Seq Experimenten aufweisen. Diese Repression geht einher mit einem Verlust an Histon-Acetylierungssignal (H3Kac), die Histon-Methylierung (H3K27me3) bleibt unverändert. Diese Gene werden offenbar durch WUS gebunden und direkt in ihrer Expression reprimiert.

Auf der anderen Seite weisen die 1497 Gene in Cluster 10 den gegenteiligen Expressionstrend auf. Sie werden in der Zeitreihe zunehmend aktiviert, was auch in den RNA-Seq Experimenten bestätigt wird. Ein klarer Trend zur Veränderung der Histon-Modifikationen kann nicht nachgewiesen werden (Abbildung Anhang 1). Bei diesem Cluster handelt es sich demnach um direkt durch WUS aktivierte Gene.

Das dritte Cluster (3) mit deutlicher WUS-Bindesignatur weist keinen klaren Expressionstrend auf. Die 1006 Gene verändern ihre Expression im Zeitreihen-Experiment kaum, in den RNA-Seq Experimenten ist der Trend uneinheitlich (Abbildung Anhang 1). Dies könnte daran liegen, dass für die Regulation dieser Gene weitere Co-Faktoren benötigt werden, oder der experimentelle Zeitrahmen zu knapp bemessen war. Außerdem könnten diese Gene ein Gewebe-spezifisches Expressionsmuster aufweisen, das bei der Analyse des gesamten Keimlings kaum detektiert werden kann. So befindet sich das Meristem-spezifische *CLVI* in diesem Cluster, das nachweislich direkt durch WUS reprimiert wird (Busch et al., 2010). Bei den Histon-Modifikationen zeigt sich eine leichte Abnahme der Acetylierung (H3Kac) und der Methylierung (H3K27me3). Obwohl keine deutliche Expressionsveränderung nach WUS-Induktion nachgewiesen werden kann, handelt auch bei diesen Genen wahrscheinlich um WUS-Zielgene.

Auch die Cluster 2 und 9 zeigen eine deutliche Veränderung der Genexpression im RNA-Seq Experiment. Diese Veränderung ist jedoch in der Gegenwart von Cycloheximid kaum noch nachweisbar und es kann keine WUS-Bindung festgestellt werden. Diese Gene scheinen daher nur indirekt durch WUS reguliert zu werden.

Obwohl sich mit Hilfe dieses kombinierten ChIP-Seq und Transkriptomansatzes eine Liste von direkt durch WUS regulierten Genen erstellen ließ, blieb weiterhin die Frage offen, ob diese Regulation so auch im SAM stattfindet. Echte WUS-Zielgene müssen im Meristem exprimiert sein. Das Expressionsmuster sollte dabei, entsprechend der Regulation durch WUS, mit dem Muster des WUS-Proteins korrelieren. Außerdem müsste die Veränderung der WUS-Expression eine veränderte Expression der Zielgene im Meristem zur Folge haben.

Um die identifizierten WUS-Zielgene daraufhin zu überprüfen, konnten zwei publizierte Datensätze genutzt werden. Busch et al., (2010) hatten in einem umfangreichen Microarray Experiment auf verschiedene Pflanzenlinien und Mutanten, in denen die WUS-Expression transient oder konstitutiv missexprimiert ist, sogenannte *WUS Regulation Scores* (WRS) errechnet. Hierzu wurden die Expressionsveränderungen spezifisch im Meristem ermittelt. Die errechneten Werte geben die kumulierte Intensität und Richtung der WUS-abhängigen Expressionsveränderung von 2226 signifikant regulierten Genen an. Betrachtet man die Verteilung der WRS auf die einzelnen Cluster, zeigt sich, dass die drei Cluster mit dem höchsten Anteil an Genen mit WRS jene Cluster sind, die als WUS-Zielgene identifiziert worden sind (Abbildung 11B). Besonders deutlich ist dies bei den direkt durch WUS reprimierten Genen in Cluster 1. In diesem Cluster weisen 28,48% aller Gene einen WRS auf, bei 24,80% ist die Regulation negativ und bei nur 3,68% positiv. Auch für das Cluster 10 der WUS aktivierten Gene ist der Anteil an Genen mit WRS mit 19,04% hoch. Hier ist der Regulations-trend jedoch umgekehrt mit 8,02% negativen und 11,02% positiven Werten. Dieses Cluster weist den höchsten Anteil an positiven WRS auf. Cluster 5 hat den drittgrößten Anteil an WRS mit 15,71% und einen Trend zu negativen Werten, mit 9,74% negativen WRS. Dieses unabhängige Experiment

bekräftigt somit nicht nur, dass es sich bei den identifizierten Genen tatsächlich um WUS-Zielgene handelt, sondern unterstützt auch den vorhergesagten Regulationstrend aus der Clusteranalyse.

Um festzustellen, ob die vorhergesagten Zielgene tatsächlich im Meristem exprimiert sind, konnte ein Zelltyp-spezifischer Expressionsdatensatz des SAM verwendet werden (Yadav et al., 2014). Für diesen Datensatz wurden die vergrößerten Meristeme einer *ap1/cal* Mutante protoplastiert und verschiedene Zelltypen im FACS sortiert. Die Gewebe-spezifische Genexpression wurde durch Microarrays ermittelt. Ein Gen wurde als spezifisch in einem Gewebe exprimiert gewertet, wenn es in diesem signifikant gegenüber den anderen angereichert war. Betrachtet man die Gewebespezifität der Gene der einzelnen Cluster aus Abbildung 11A, zeigt sich, dass lediglich jene der Cluster 1,2,3 und 10 in Bereichen des Meristems und der Primordien signifikant angereichert sind (Abbildung 11C). Die mutmaßlich direkt durch WUS reprimierten Gene aus Cluster 1 sind signifikant überrepräsentiert im abaxialen Teil der Primordien und in der Meristemperipherie, nicht jedoch im Zentrum. Die wahrscheinlich indirekt durch WUS reprimierten Gene (Cluster 2) sind vermehrt im abaxialen Teil der Primordien exprimiert. Die Gene aus Cluster 3 sind im wildtypischen Meristem v.a. in der Peripherie des Meristems exprimiert. Eine präferenzielle Expression im Zentrum des Meristems findet man nur für die durch WUS aktivierten Gene aus Cluster 10. Sie sind signifikant im Zentrum und in der Peripherie des Meristems exprimiert. Über den Bereich um das Zentrum des Meristems kann keine Aussage getroffen werden, da hierfür kein Datensatz erhoben wurde. Die vorgefundenen Expressionsmuster zeigen jedoch, dass die WUS-Zielgene tatsächlich im Meristem exprimiert werden und ihr Expressionsmuster passt zur vorhergesagten Regulation durch WUS.

Mit Hilfe der Clusteranalyse auf einen kombinierten Datensatz aus globalen epigenetischen und transkriptionellen Daten konnten drei Cluster an Genen identifiziert werden, die sowohl durch WUS gebunden, als auch reguliert werden. Sie sind im Meristem exprimiert und ihr Expressionsmuster entspricht der Regulation durch WUS. Diese Regulation konnte unabhängig bestätigt werden. Auch wenn letztlich jedes vorhergesagte WUS-Zielgen einzeln überprüft und bestätigt werden muss, um wirklich als Zielgen zu gelten, können die drei Population insgesamt als WUS-Zielgene angesehen werden und zur weiteren Analyse der WUS-Funktion herangezogen werden.

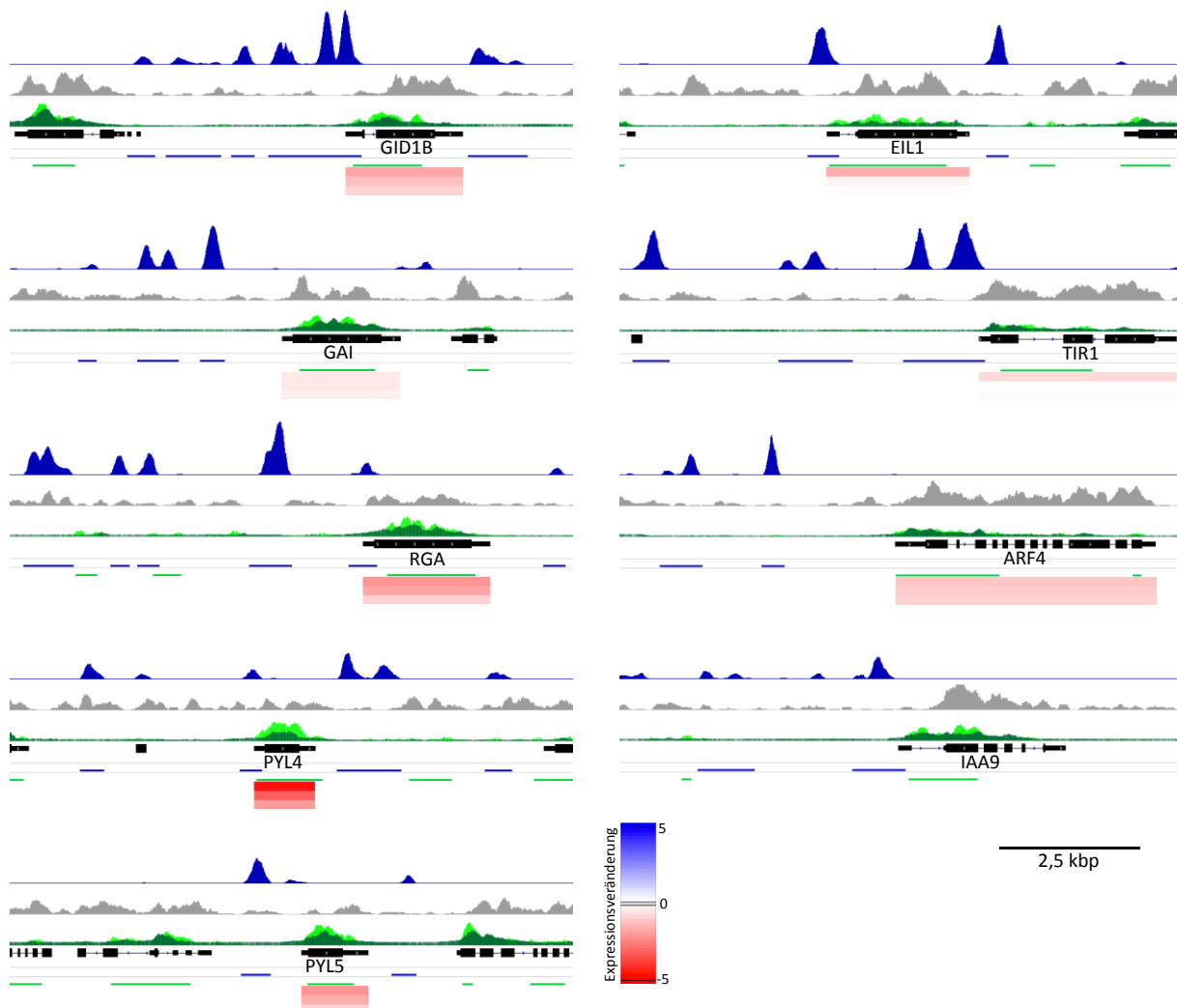
#### **IV.3.3 Analyse der WUS-abhängigen transkriptionellen Repression**

Neben der Identifikation der WUS-Zielgene, konnte die Clusteranalyse mit einem weiteren interessanten Detail aufwarten. Die WUS-abhängige transkriptionelle Repression scheint mit einer Abnahme an Histon 3 Acetylierung (H3ac) einher zu gehen (Abbildung 11A). Ob es sich hierbei um einen kausalen Zusammenhang handelt, wurde nachfolgend überprüft.

Die globale Abnahme an H3ac konnte auch im Detail bei Betrachtung einzelner Loci gut nachvollzogen werden (Abbildungen 12, 14D). Die Acetylierungssignale sind nicht gleichmäßig über die



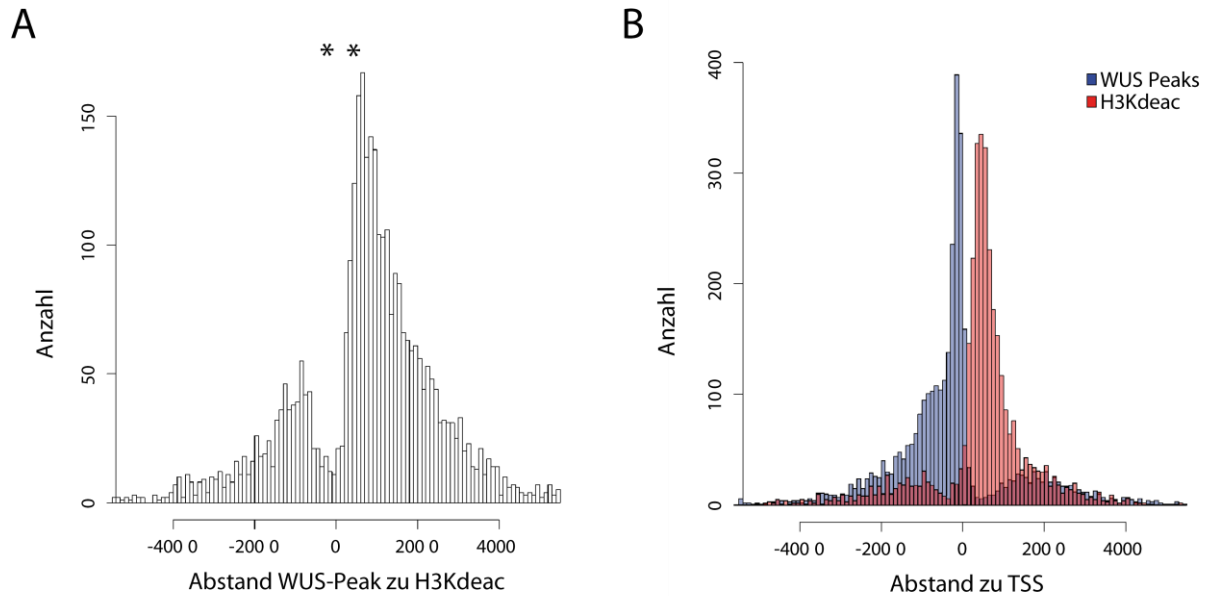
einzelnen Loci verteilt, sondern auf mehrere lokale Maxima verteilt, die zu den Nukleosomen-Positionen passen.



**Abb. 12: WUS-induzierte Veränderung der Acetylierung wichtiger Gene zur Hormon-Signaltransduktion.**

Darstellung der ChIP-Seq Signal-Tracks und identifizierter Bindestellen in genomischen Regionen um Schlüsselkomponenten der Signaltransduktion verschiedener Pflanzenhormone. ChIP-Seq Tracks: WUS (blau), Histon 3 (grau), H3Kac Modifikationen vor (hellgrün) und nach (dunkelgrün) WUS-Induktion. Regionen: WUS-Bindestellen (blau), Abnahme an Histon 3 Acetylierung (grün). Gen-Model in schwarz, 5'-3'-Orientierung von links nach rechts. Expressionsveränderungen ( $p_{adj} < 0,05$ ): Nach WUS-Induktion (oben), nach WUS-Induktion mit Cyclo (mitte) und nach WUS-Induktion mit TSA (unten).

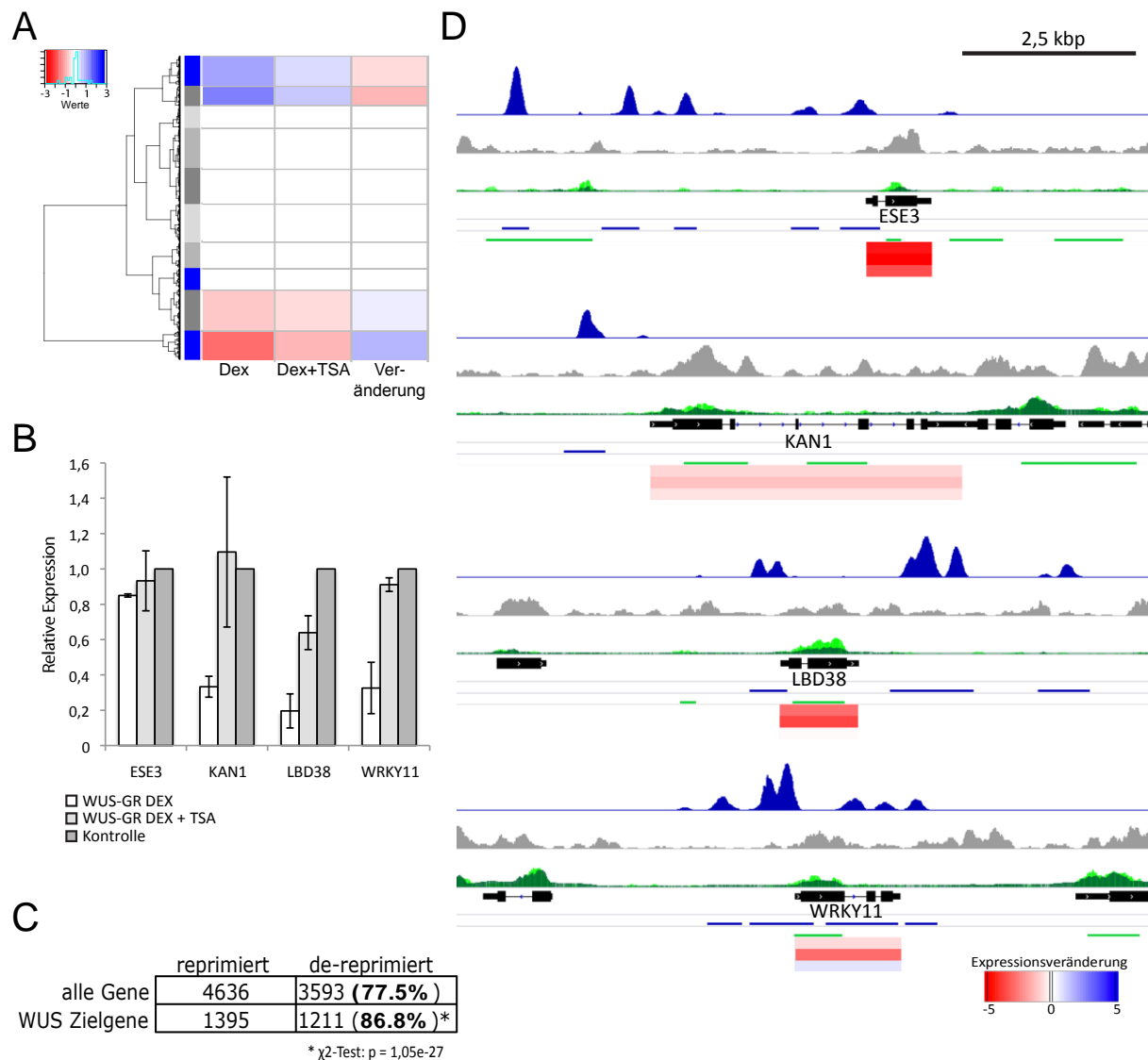
Sollte die Bindung von WUS im Promoterbereich die Abnahme der Acetylierung des Locus bedingen, so müsste es eine räumliche Korrelation zwischen beiden Ereignissen geben. Betrachtet man die Region um das Zentrum der 5874 durch WUS gebundenen Bereiche (Abbildung 8B), findet man einen signifikanten ( $p < 0,029$ ) Überlapp mit den 20 242 deacetylierten Regionen ab einem Abstand von 400bp der sehr gut mit dem relativen Abstand der beiden Regionen korreliert (Abbildung 13A). Während die WUS-Bindungen größtenteils oberhalb des Transkriptionsstarts gefunden werden (Abbildung 8E), findet die Abnahme der Acetylierung im Bereich des Gen-Locus, v.a. an Nukleosomen im 5'-Abschnitt, statt (Abbildung 13B).



**Abb. 13: Räumliche Korrelation der WUS-Bindung und Deacetylierung.**

**A** Histogramm der Abstände der Histon 3 Deacetylierungen (H3Kdeac) zur WUS-Bindestelle (WUS-Peak). Ab einem Abstand von 400bp ist die Korrelation statistisch signifikant (\*: Fisher Exakt Test  $p < 0,03$ ). **B** Histogramm der Abstände von WUS Peaks und H3deac zum nächsten Transkriptionsstart (TSS).

Nachdem die Abnahme an Histon-Acetylierung räumlich signifikant mit der WUS-Bindung korreliert, stellt sich die Frage, ob diese epigenetische Veränderung für die Repression der WUS-Zielgene verantwortlich ist. In diesem Fall müsste die Unterbindung von Histon-Deacetylierungen, durch die globale Inhibition von Histon Deacetylasen (HDAC) mit Hilfe des Inhibitors Trichostatin A (TSA), eine De-Repression der sonst durch WUS reprimierten Gene zur Folge haben. Um dies zu testen, wurde der WUS-Effekt in der Gegenwart von  $1\mu\text{M}$  TSA in Keimlingen induziert und mit dem normalen Effekt verglichen. Von insgesamt 4636 in der Gegenwart von WUS reprimierten Genen wurden 77,5% (3593) durch TSA de-reprimiert, d.h. sie waren nicht mehr so stark wie zuvor reprimiert. Betrachtet man nur die identifizierten WUS-Zielgene (Abbildung 11), so werden von den 1395 reprimierten Genen 1211 (86,8%) durch TSA-Behandlung de-reprimiert. Dieser höhere Anteil als in der Gesamtpopulation ist statistisch signifikant ( $\chi^2$ -Test:  $p = 1,05\text{E-}27$ ). Wie ebenfalls in Abbildung 14A dargestellt, sind v.a. die direkt durch WUS reprimierten Gene vom TSA-Effekt betroffen, was einen direkten Mechanismus nahelegt. Die De-Repression wurde anhand einzelner, durch WUS direkt reprimierter Zielgene durch qPCR verifiziert (Abbildung 14B). Sie bestätigen den Effekt von TSA über die ganze Bandbreite der WUS-Repression.

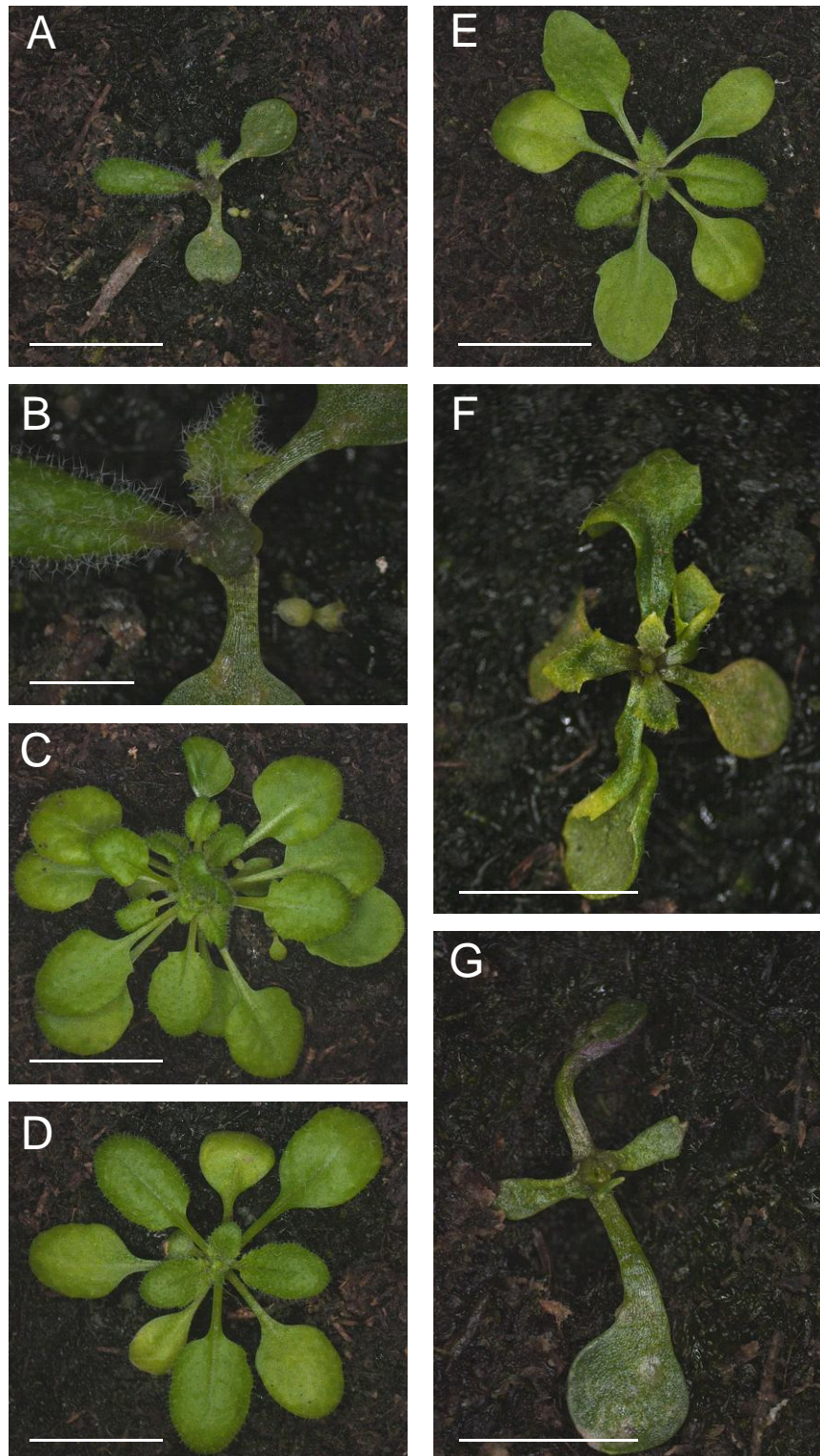


**Abb. 14: TSA-Behandlung unterdrückt die WUS-induzierte Repression durch Deacetylierung.**

**A** Heatmap des TSA-Effekts auf die WUS-induzierte Genregulation, Cluster wie in Abb. 11. **B** Validierung des TSA-Effekts auf vier reprimierte WUS-Zielgene durch qRT-PCR ( $n=3$ ). **C** Zusammenfassung des TSA-Effekts auf alle Gene und auf sämtliche durch WUS reprimierte Zielgene. **D** Darstellung der ChIP-Seq Signal-Tracks und identifizierter Bindestellen in genomischen Regionen naher der Gene aus **B**. ChIP-Seq Tracks: WUS (blau), Histon 3 (grau), H3Kac Modifikationen vor (hellgrün) und nach (dunkelgrün) WUS-Induktion. Regionen: WUS-Bindestellen (blau), Abnahme an Histon 3 Acetylierung (grün). Gen-Model in schwarz, 5'-3'-Orientierung von links nach rechts. Expressionsveränderungen ( $\text{padj} < 0,05$ ): Nach WUS-Induktion (oben), nach WUS-Induktion mit Cyclo (mitte) und nach WUS-Induktion mit TSA (unten).

Diese Ergebnisse sprechen für einen Mechanismus, bei dem eine WUS-abhängige Deacetylierung zu einer Repression der Zielgene führt. WUS könnte demnach die Promoterbereiche markieren, an denen sich ein molekularer Komplex mit Histon-Deacetylasefunktion bildet. Um dieses Modell auf die Spitze zu treiben, wurde überprüft, ob die Fusion einer Histondeacetylase (*HDA19*) an ein funktionsloses WUS die verlorene Funktion retten kann. Hierzu wurde eine WUS-Variante verwendet, in der die konservierte und für die Repression notwendige WUS-Box (Ikeda et al., 2009) mutiert wurde, ohne weitere Funktionen von WUS einzuschränken (Daum et al., 2014). Weder unter der Kontrolle des

*CLV3* Promoters noch des Blüten-spezifischen *AP3* Promoters zeigten sich die typischen Phänotypen (Lenhard et al., 2001; Brand et al., 2002). Während für *pAP3* alle 48 unabhängigen transgenen Linien wildtypisch erschienen (keine Abbildung), zeigte eine *pCLV3*-Linie einen frühzeitigen Meristem- und Blattentwicklungsarrest und eine Umwandlung der jungen Blätter in radiäre Strukturen (Abbildung 15G). Eine weitere Linie wies einen Blattphänotyp mit gezackten Rändern und einem Verdrehen der Blätter und einen frühzeitigen Meristemarrest auf (Abbildung 15F). Die übrigen 45 unabhängigen Linien waren jedoch ohne Auffälligkeiten (Abbildung 15E). Die einfache Fusion an eine HDAC kann den Funktionsverlust durch die Mutation der *WUS-Box* demnach nicht ersetzen.



**Abb. 15: Die direkte Fusion von HDA19 kann den Funktionsverlust durch Mutation der WUS-Box in WUS nicht retten.**

Phänotypischer Effekt von WUS Fusionsproteinen in den Stammzellen des SAM bei Blühbeginn. **A-C** Typische Meristemvergrößerungen in der *pCLV3::WUS-GFP* Linie. **A** Übersicht und **B** Detail eines überproliferierenden, unstrukturierten Meristems. **C** Vergrößertes Meristem mit zusätzlichen Organen. **D** Kein erkennbarer Effekt von *pCLV3::WUSΔbox-GFP*. **E-G** Phänotypen von *pCLV3::WUSΔbox-HDA19*. **E** Wildtypischer Phänotyp, wie in 44 weiteren unabhängigen Linien. **F** und **G** zwei Individuen mit verändertem Blatt- und Meristemphänotyp. Maßstab: **A,C,D,E** 1cm, **B** 2,5mm, **F,G** 5mm.

## IV.4 Die biologische Funktion der WUS-abhängigen Regulation

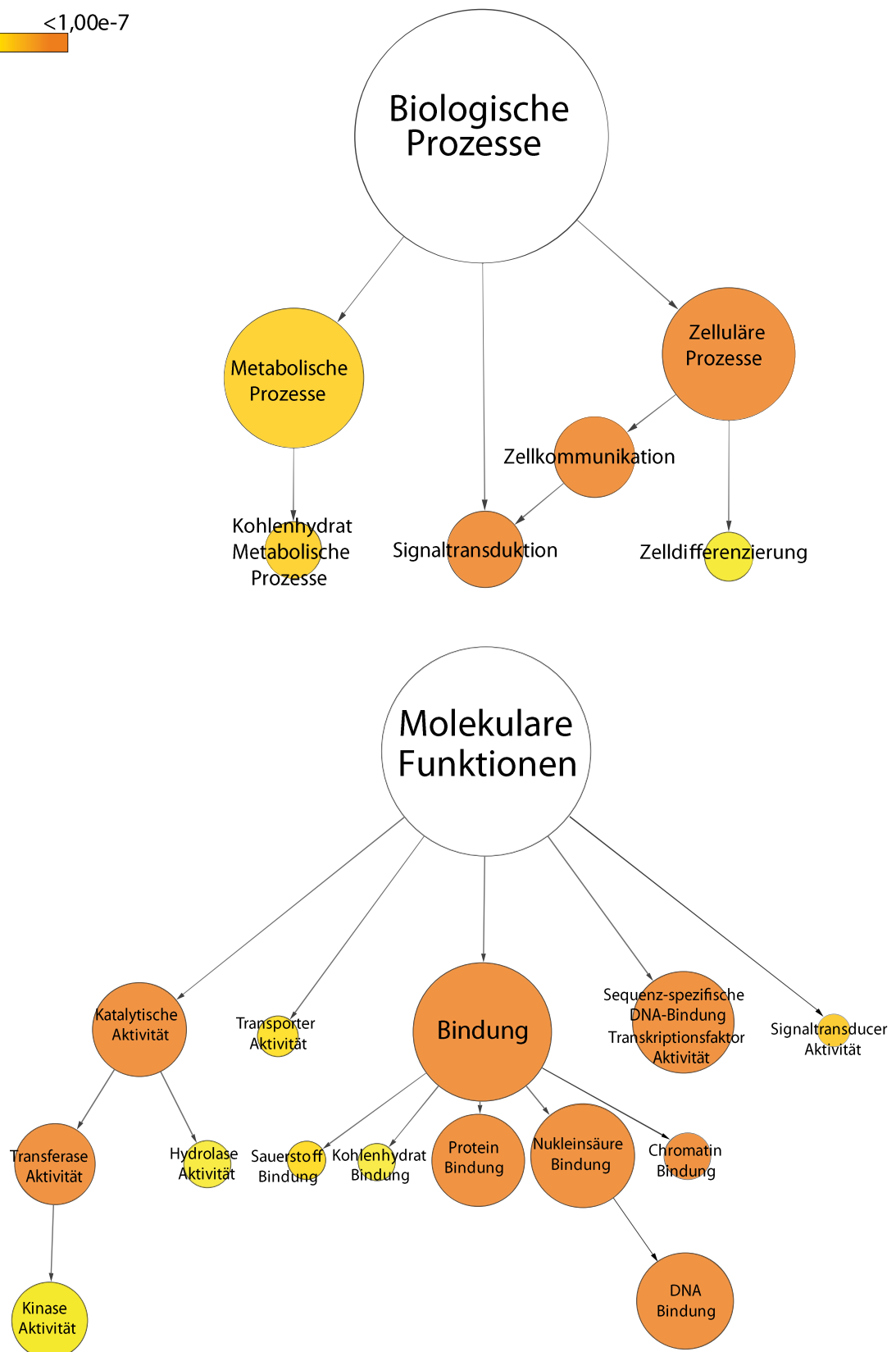
Nachdem im vorangegangenen Abschnitt die unmittelbar durch WUS regulierten Gene identifiziert wurden, stellt sich nun die Frage, ob sich hierdurch die Bedeutung von WUS für den Erhalt der Stammzellpopulation im SAM erklären lässt. Nachdem bislang keine Mutante eines einzelnen Gens isoliert werden konnte, die einen vergleichbar dramatischen Effekt auf die Stammzellpopulation hat und im WUS-Signaltransduktionsweg platziert werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass die WUS-Funktion im SAM nicht durch ein einzelnes Zielgen vermittelt wird. Auch die bislang charakterisierten Zielgene deuten an, dass die WUS-Funktion durch die Regulation von verschiedenen Prozessen und Signaltransduktionswegen erfolgt: Von der Repression von Differenzierungsfaktoren (*AG*, *AS2*, *HEC1*, *KAN1*, *KAN2*) über die Regulation von Hormon-Signaltransduktionskomponenten (*ARR7*), bis zur Repression des eigenen Repressors *CLV1*. Im folgenden Abschnitt wird daher die biologische Funktion der WUS-Zielgene, zunächst global im Überblick, dann mit Fokus auf Hormon-Signaltransduktionswege, analysiert.

### IV.4.1 Globale Charakterisierung der WUS-Zielgene

Um die Funktion verschiedener Gene und Genpopulationen beschreiben und miteinander vergleichen zu können, wurde das *Gene Ontology Project* ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)) gegründet. Es stellt einen allgemeinen Wortschatz für die Beschreibung der molekularen Funktionen und biologischen Prozesse, an denen das jeweilige Gen beteiligt ist, zu Verfügung (Maere et al., 2005). Diese begrifflichen Kategorien sind hierarchisch gegliedert, so dass tieferstehende Gen Ontologie (GO) Termini in den übergeordneten enthalten sind. Diese Kategorien sind bioinformatisch analysierbar, indem überrepräsentierte Funktionen und Prozesse in Datensätzen ermittelt werden. Genpopulationen aus tausenden von Genen lassen sich so durch ihre Gemeinsamkeiten beschreiben.

Betrachtet man die WUS-Zielgene, so sind sie einerseits an metabolischen Prozessen, insbesondere des Kohlenhydratmetabolismus, und andererseits an zellulären Prozessen, wie Zellkommunikation, Zelldifferenzierung und Signaltransduktion beteiligt (Abbildung 16). Bei den molekularen Funktionen spiegelt sich dies größtenteils wider (Abbildung 16). Neben einem großen Anteil an Termini mit DNA- und Chromatin-Bindeaktivität, finden sich auch Signaltransducer Aktivität, Protein Bindeaktivität und Kinase Aktivität, was gut zu Zellkommunikation, Zelldifferenzierung und Signaltransduktion passt. Dies passt zu einer Rolle von WUS als Knotenpunkt eines umfangreichen Genregulations-Netzwerks. Zusätzlich finden sich Sauerstoff und Kohlenhydrat Bindeaktivität und Hydrolaseaktivität unter den überrepräsentierten Funktionen der WUS-Zielgene.

1,00e-2      <1,00e-7

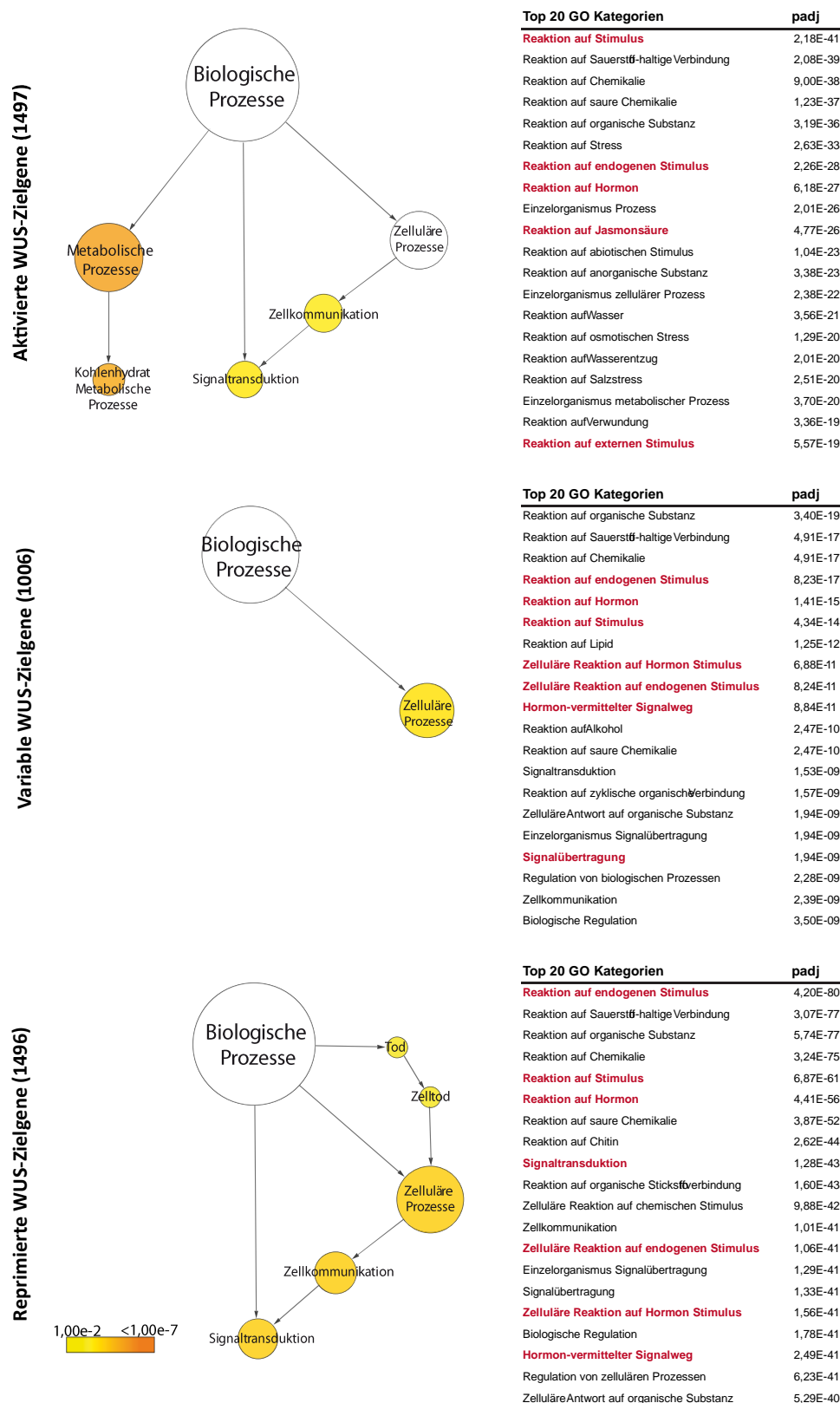



**Abb. 16: Genontologie-Analyse der WUS-Zielgene.**

Schematische Darstellung der signifikant überrepräsentierten Genontologie Termini (Plant slim package) der WUS-Zielgene für Biologische Prozesse und Molekulare Funktionen. Die Größe der Kreise entspricht der relativen Anzahl an Genen des Terminus. Die Farben entsprechen dem korrigierten Signifikanzniveau (Benjamini-Hochberg).

Bei genauerer Betrachtung der biologischen Prozesse, aufgetrennt nach den drei identifizierten Clustern an WUS-Zielgenen (Abbildung 11A), zeigt sich, dass jeweils GO Termini am deutlichsten überrepräsentiert sind, die in Zusammenhang mit Signaltransduktion und einer Antwort auf einen Stimulus, insbesondere auf Hormone, stehen (Abbildung 17). Könnte es daher sein, dass WUS seine Funktion über die Regulation spezifischer Hormon-Signaltransduktionsprozesse ausübt?

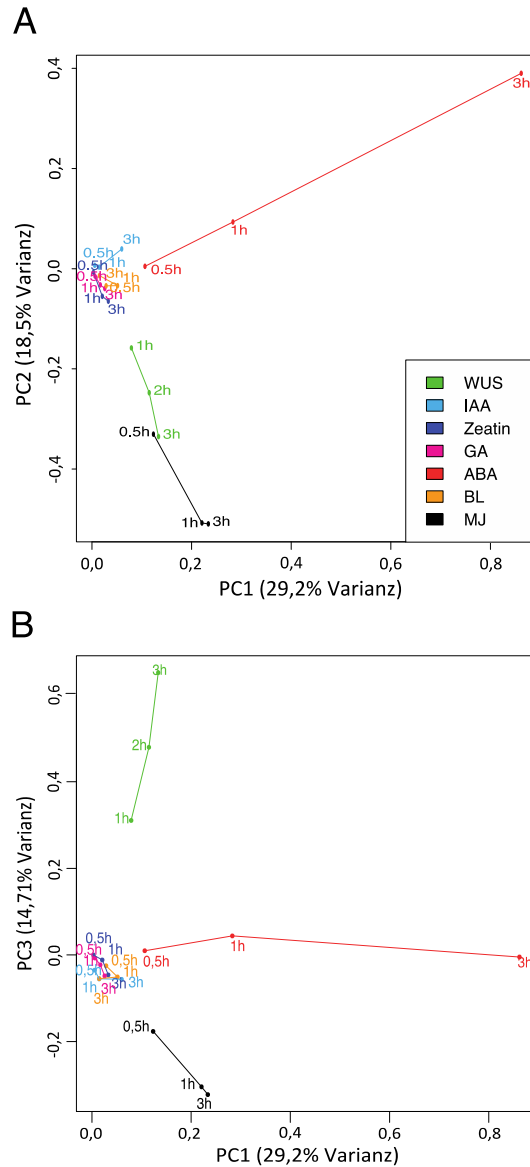




**Abb. 17: Genontologie-Analyse der WUS-Zielgencluster.**

Übersicht der Genontologie (GO) Termini der WUS-Zielgene, unterteilt in aktiviert (Cluster 10), variabel (Cluster 3) und reprimiert (Cluster 1). Schematische Darstellung der signifikant überrepräsentierten Genontologie Termini (Plant slim package) mit Angabe der Anzahl der Gene des Clusters und Auflistung der 20 signifikantesten GO Kategorien. Kategorien mit Beziehung zu Hormon-Signaltransduktion wurden rot hervorgehoben.

Um diese Frage zu beantworten, wurden die Effekte der WUS-Induktion auf das Transkriptom in einer Hauptkomponenten Analyse mit den Effekten von Hormon-Behandlungen verglichen (Abbildung 18). Auf Grund der hohen Komplexität dieses Experiments, konnten die ersten drei Hauptkomponenten jeweils nur 29,2%, 18,46% und 14,71% der Gesamtvarianz darstellen. Dennoch lässt sich der zeitliche Verlauf der einzelnen Behandlungen in einem Plot der ersten beiden Hauptkomponenten, mit Ausnahme von Brassinosteroid (BL), gut nachvollziehen. Im zweidimensionalen Plot ergeben sich dabei zwei Hauptachsen, die eine mit stark positiver Ausrichtung in Komponente 1 (PC1) und leicht positiver Ausrichtung in Komponente 2 (PC2), die zweite mit leicht positiver Ausrichtung in PC1 und stark negativer Ausrichtung in PC2. Zur Ersten gehören die Experimente mit Auxin (IAA) und Abscisinsäure (ABA) Behandlung, zur Zweiten die Behandlungen mit Cytokinin (Zeatin), Gibberellin (GA), Jasmonat (MJ) und WUS. Außerdem lassen sich die Experimente nach Beitrag zu den einzelnen Hauptkomponenten trennen. Während Auxin, Cytokinin, Gibberellin und Brassinolid Behandlungen nur einen kleinen Einfluss auf die Gesamtvarianz des Experiments haben, werden die Hauptkomponenten v.a. durch Abscisinsäure auf der einen und Jasmonat und WUS auf der anderen Seite definiert. Der Einfluss von Jasmonat ist dabei sogar stärker als der von WUS. Die Vermutung, dass der WUS-Effekt schlicht auf einer Regulation der durch Jasmonat regulierten Gene beruht, kann bei Betrachtung der dritten Hauptkomponente (PC3) widerlegt werden. In dieser Dimension trennen sich die beiden Experimente deutlich voneinander.

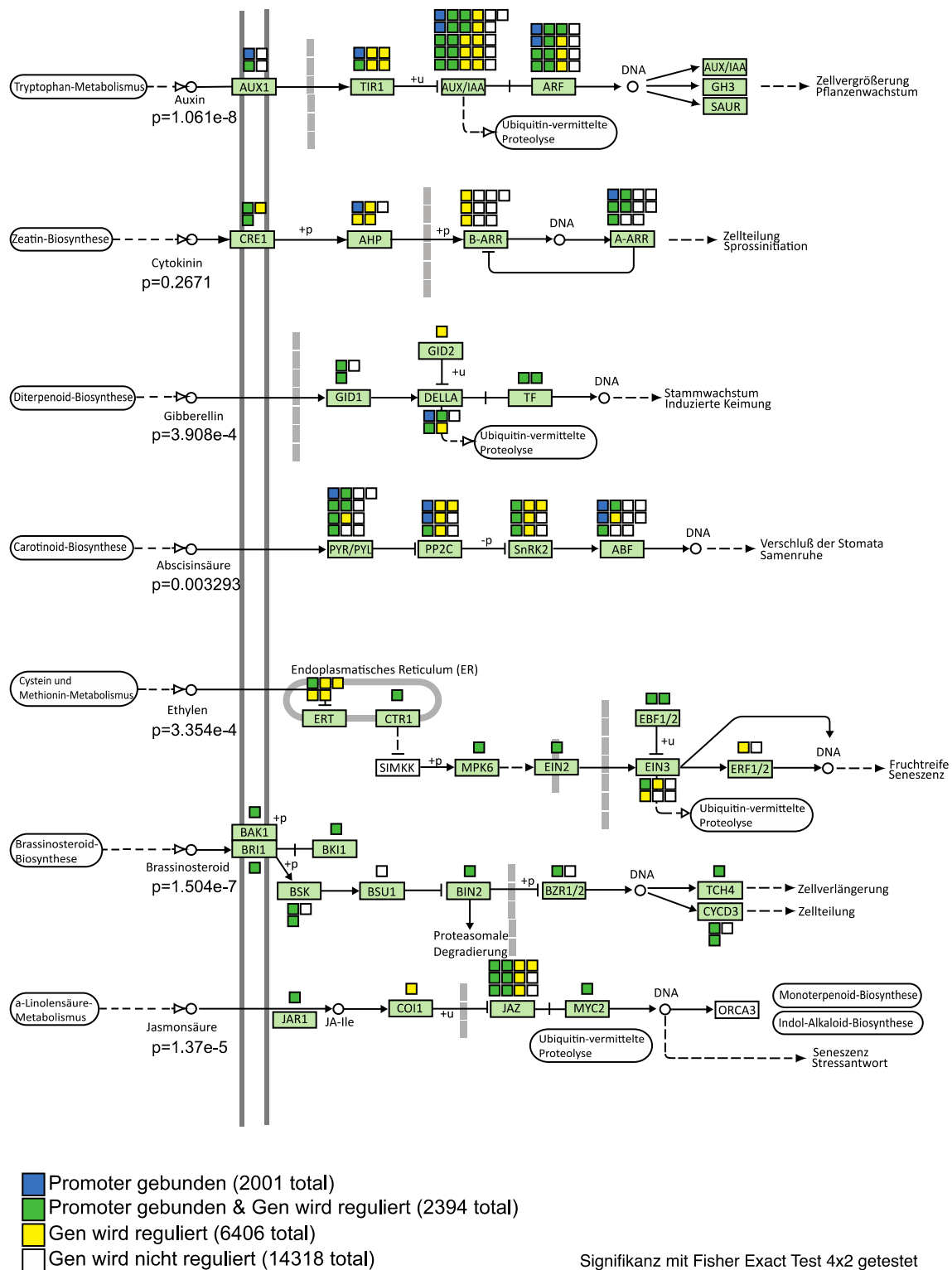


**Abb. 18: Die WUS-Induktion im Vergleich zu Hormon-Behandlungen.**

Hauptkomponentenanalyse der Expressionsveränderungen nach WUS-Induktion (Utan, 2012) und Hormon-Behandlung in Keimlingen (Goda et al., 2008) relativ zur jeweiligen Kontrolle. **A** Hauptkomponente 1 (PC1) gegen Hauptkomponente 2 (PC2). **B** Hauptkomponente 1 (PC1) gegen Hauptkomponente 3 (PC3). Die Behandlungszeiten sind angegeben. WUS: WUS-GR Induktion mit 25µM DEX, IAA: 1µM Indol-3-essigsäure (Auxin), Zeatin: 1µM Zeatin (Cytokinin), GA: 1µM Gibberellinsäure 3, ABA: 10µM Abscisinsäure, BL: 10nM Brassinolid, MJ: 10µM Methyljasmonat.

Zwar kann der WUS-Effekt, wie die Hauptkomponenten Analyse zeigt, nicht auf die Regulation von Hormon-regulierten Genen reduziert werden, dennoch fügt er sich so gut in das Koordinatensystem ein, dass im Nachfolgenden ein genauerer Blick auf die Regulation dieser Signaltransduktionswege geworfen wird.

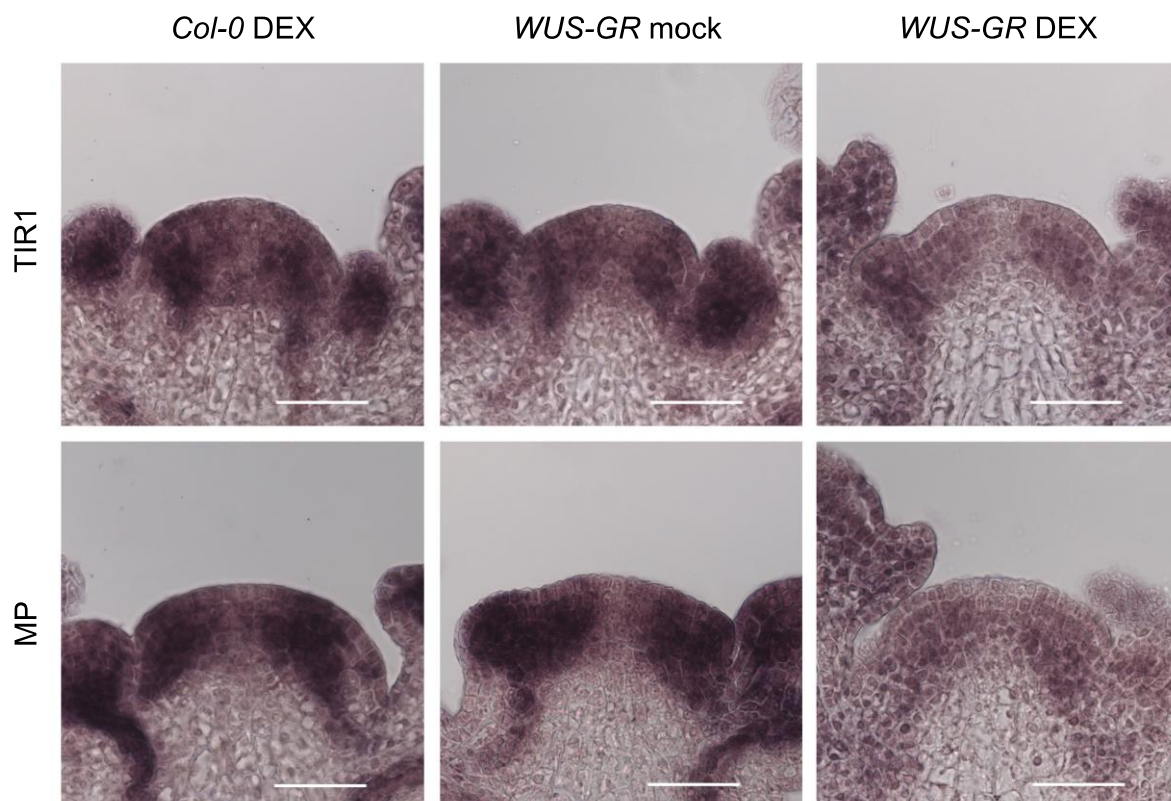
Nachdem die bisherigen Analysen auf den identifizierten WUS-Zielgenpopulationen beruhten, werden für eine detaillierte Auswertung wieder die ursprünglichen Datensätze der ChIP-Seq und RNA-Seq Experimente verwendet. Auf diese Weise wird die höchste Auflösung der Daten für die Analyse einzelner Gene sichergestellt. Die globale Analyse der durch WUS regulierten biologischen Prozesse und der Vergleich des WUS-Effekts mit Hormon-Behandlungen legen nahe, dass WUS direkt auf die Hormon-Signaltransduktion wirken kann. Betrachtet man die einzelnen Komponenten der Signaltransduktionswege, unabhängig davon, ob sie im Meristem überhaupt exprimiert sind, so bestätigt sich dies (Abbildung 19). WUS bindet, meistens mit signifikanter Regulation des jeweiligen Gens, nahezu alle Komponenten der unterschiedlichen Signaltransduktionswege. Besonders deutlich wird dies bei den Signaltransduktionswegen für Auxin, Brassinosteroid und Jasmonat. Lediglich für Cytokinin ist diese Korrelation nicht signifikant, da die *ARRs* des Typs-B (*B-ARR*) nicht direkt durch WUS reguliert werden.



**Abb. 19: WUS-Zielgene in Pflanzen Hormon-Signaltransduktionswegen.**

Modifizierte Darstellung der KEGG „Plant Hormone Signal Transduction“ Karte mit schematischer Darstellung verschiedener Hormon Signaltransduktionswege entsprechend der KEGG Richtlinien (nach Ogata et al., 1998). Quadrate über den einzelnen Modulen entsprechen der Anzahl an Genen in *Arabidopsis* für diese Funktion (Expression in SAM wird nicht vorausgesetzt). Die Farbe gibt an, ob das jeweilige Gen durch WUS gebunden (blau), gebunden und reguliert (grün), reguliert (gelb) oder unbeeinflusst (weiß) ist. Die Gesamtzahl der Gene jeder Kategorie im Genom ist angegeben. Die Überrepräsentation dieser Kategorien in den einzelnen Signalwegen wurde mit Hilfe des Fisher Exakt Tests (4x2) getestet, die Signifikanzniveaus sind angegeben.

Bei dieser Analyse wird die Richtung der Regulation nicht berücksichtigt, da sie sich Gewebespezifisch sehr unterscheiden kann, die Daten aber den Durchschnitt des gesamten Keimlings wiedergeben. Durch sie wird also lediglich veranschaulicht, welche Schlüsselstellen der Signaltransduktionswege durch WUS direkt reguliert werden können, nicht aber wie der Signalweg als Ganzes reguliert wird. Diese Frage muss für jede Komponente und jeden Signaltransduktionsweg einzeln im relevanten Gewebe überprüft werden. Erste Versuche in dieser Richtung auf Kreuzungen zwischen Reporterlinien und der *WUS-GR* Linie laufen bereits, die Resultate sind jedoch noch vorläufig (Abbildung Anhang 3 digital). Außerdem wurden einzelne wichtige Komponenten der Auxin-Signaltransduktion im Meristem nach der WUS-Induktion von Frau Dr. Anna Medzihradszky durch *in situ* Hybridisierung untersucht (Abbildung 20). Sie belegen, dass sowohl der Auxin-Rezeptor *TIR1*, als auch der Auxin-abhängige Transkriptionsfaktor *ARF5/MONOPTEROS* (*MP*) im Meristem durch WUS reprimiert werden können.



**Abb. 20: WUS-abhängige Repression wichtiger Auxin Signaltransduktionskomponenten im SAM.**

*In situ* Hybridisierung zur Detektion der Expressionsmuster von *TIR1* und *MP* im SAM im Wildtyp (*Col-0* DEX), ohne WUS-Induktion (*WUS-GR* mock) und 24h nach WUS-Induktion (*WUS-GR* DEX). Proben mit derselben Sonde wurden parallel behandelt und entwickelt. Maßstab: 40µm.

*In situ* Hybridisierung und Bilder von Frau Dr. Anna Medzihradszky.

Sowohl die Analyse der biologischen Funktion der direkt durch WUS regulierten Gene als auch das Verhalten des Transkriptoms nach WUS-Induktion oder Hormonbehandlung, legen nahe, dass ein wichtiger Teil der WUS-Funktion in der Regulation von Hormon-Signaltransduktionswegen liegt. Dies konnte bei genauerer Betrachtung untermauert werden, da die meisten Schlüsselstellen der verschiedenen Hormon-Signaltransduktionswege direkt durch WUS gebunden oder reguliert werden können. Für die ersten Komponenten konnte diese Regulation bereits im Meristem bestätigt werden. Ob die Regulation dieser Komponenten durch WUS im Meristem überhaupt von Bedeutung ist, muss jedoch durch funktionelle Analysen abgeklärt werden. So laufen bereits erste Versuche, bei denen die WUS-Funktion spezifisch in den Stammzellen unterbunden wird (siehe Daum et al., 2014), um das Expressionsverhalten der mutmaßlich direkt reprimierten Komponenten im SAM zu testen. Außerdem wurden *MP* und *TIR1* von der Regulation durch WUS entkoppelt, indem sie direkt unter die Kontrolle des *pCLV3* gestellt wurden. Diese und weitere Analysen werden zeigen, ob die Repression der Auxin-Signaltransduktion im Bereich der CZ notwendig für den Erhalt der Stammzellen ist.

#### **IV.5 Ähnlich und doch verschieden: Vergleich der WUS-Bindung mit anderen Transkriptionsfaktoren**

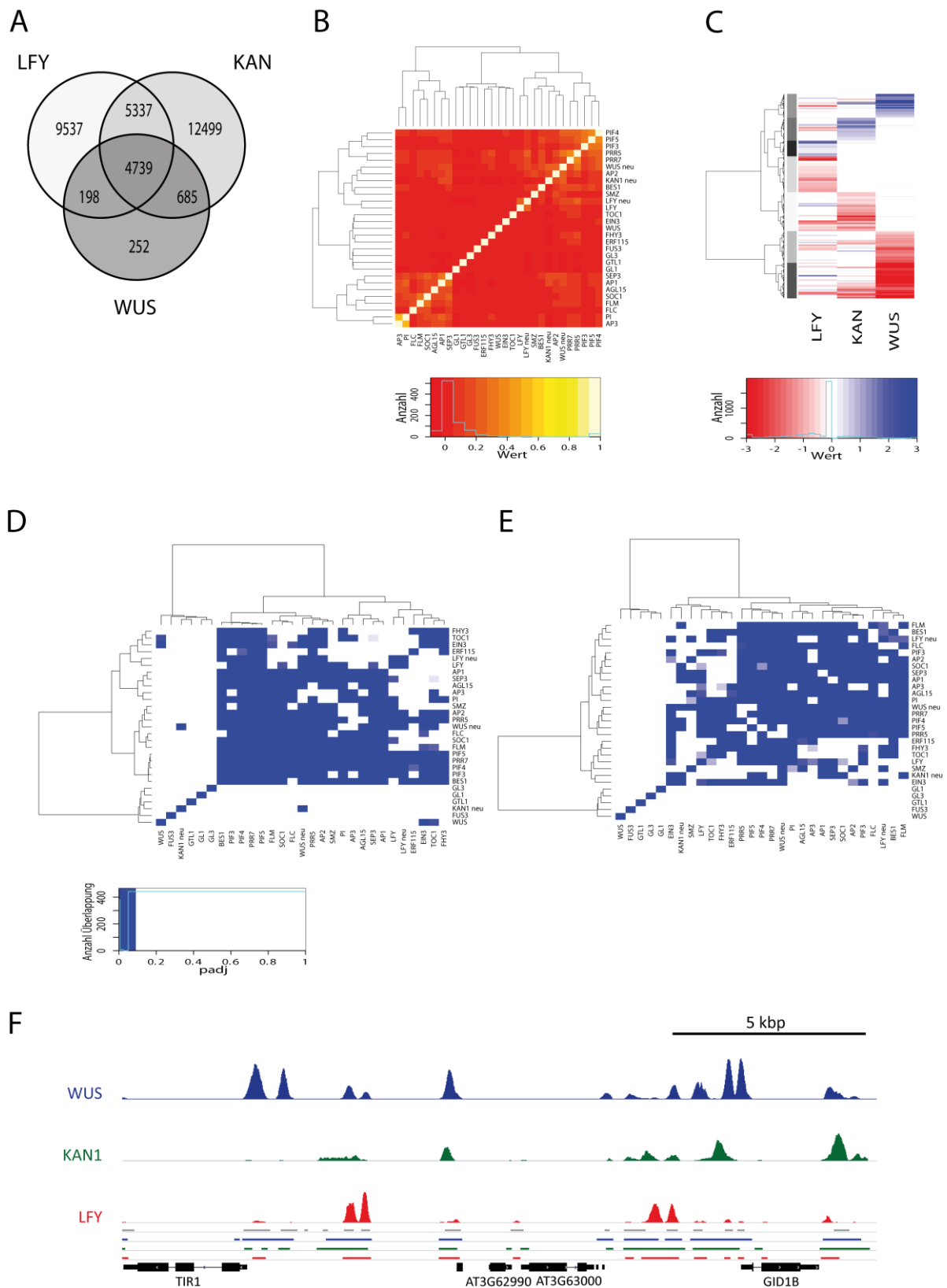
Die vorliegenden Daten stammen zum größten Teil aus Experimenten, bei denen die WUS-Aktivität ektopisch, ubiquitär in der Pflanze induziert wurde. Auch wenn bereits gezeigt werden konnte, dass die direkt durch WUS regulierten Gene zu einem großen Teil auch im apikalen Sprossmeristem exprimiert und dort wahrscheinlich auch durch WUS reguliert werden können (Abbildung 11), stellt sich nachwievor die Frage nach der Spezifität dieser Interaktionen. Handelt es sich dabei tatsächlich um WUS-spezifische Regulationen, oder sind sie dem experimentellen Aufbau geschuldet? Würde jeder andere Transkriptionsfaktor unter denselben Bedingungen die gleichen Regionen binden und Gene regulieren? Um dies zu beantworten, wurde auf öffentlich zugängliche Datensätze mit Bindeinformationen pflanzlicher Transkriptionsfaktoren zugegriffen (Heyndrickx et al., 2014). Für die Transkriptionsfaktoren *LEAFY* (*LFY*) und *KANADII* (*KAN*) liegen zusätzlich hochauflösende Bindeprofile (Moyroud et al., 2011, Wenkel et al., 2013) und Transkriptomdaten (Winter et al., 2011, Reinhart et al., 2013) vor. Sie wurden ebenfalls durch Induktion der Transkriptionsaktivität mit Hilfe des GR-Systems im gesamten Keimling erzeugt. Daher lassen sie sich sehr gut mit den WUS-Daten vergleichen.

Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Bindedaten zu gewährleisten, wurden die Rohsequenzen der CHIP-Seq Experimente für *LFY* und *KAN* entsprechend der hier vorgestellten WUS-Daten neu analysiert. So konnten für *LFY* 19 811 und für *KAN* 23 260 gebundene Regionen identifiziert werden. Verglichen mit den 5874 durch WUS gebundenen Regionen, stellt man fest, dass 4937 Regionen auch durch *LFY* und 5424 Regionen durch *KAN* gebunden werden. Davon zeichnen sich 4739 Regionen durch eine Bindung durch alle drei Faktoren aus (Abbildung 21A). Könnte es daher sein, dass der größte Teil der durch WUS gebundenen Regionen gar nicht spezifisch gebunden

wird, sondern eine Affinität für jeden ähnlich exprimierten Faktor aufweist? Der Vergleich mit 26 weiteren Bindeprofilen scheint diese Annahme zu unterstützen. Der größte Teil der untersuchten Transkriptionsfaktoren weist Bindeprofile auf, die signifikant mit den Profilen der meisten anderen Faktoren überlappen (Abbildung 21D). Auch wenn man die Binderegionen auf die 20 Basen um das Zentrum reduziert, verändert sich das Ergebnis kaum (Abbildung 21E). Die große Ähnlichkeit der Bindeprofile von WUS, LFY und KAN spiegelt somit lediglich einen allgemeinen Trend von Bindeeigenschaften pflanzlicher Transkriptionsfaktoren wider. Dennoch unterscheiden sich die globalen Bindeprofile der einzelnen Faktoren und können hierarchisch geclustert werden (Abbildung 21B). In dieser Analyse ähnelt WUS am meisten dem Transkriptionsfaktor AP2. Auch bei dieser Gruppierung ähneln sich die Bindeprofile von WUS, LFY und KAN.

Bei genauer Betrachtung der gebundenen Regionen fällt jedoch auf, dass zwar tatsächlich die gleichen Regionen von allen drei Faktoren gebunden werden, die exakte *Peak*-Position und relative Höhe sich jedoch teils deutlich unterscheiden (Abbildung 21F). Auch wenn man sich die Expressionsveränderungen der 2508 potentiell regulierten Gene, über die 4739 gemeinsamen Binderegionen betrachtet, fallen deutliche Unterschiede zwischen den Faktoren auf (Abbildung 21C). Zwar weisen 1305 Gene überhaupt keine signifikante Expressionsveränderung nach Induktion der einzelnen Faktoren auf, die übrigen 1203 Gene gruppieren sich jedoch in distinkten Gruppen. Auch wenn es einzelne Gruppen an Genen gibt, die durch mehrere Faktoren reguliert werden, so werden sie doch größtenteils durch je nur einen Faktor reguliert. Für jeden Faktor findet sich je ein Cluster an spezifisch aktivierten und reprimierten Genen. Diese Ergebnisse zeigen, dass unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, selbst bei Bindung der gleichen Promoterbereiche, sehr unterschiedliches Potential zur Genregulation besitzen. Der sehr große Überlapp an Bindestellen zwischen den verschiedenen Faktoren kann demnach tatsächlich eine biologische Funktion haben, zumal es sich bei WUS, LFY und KAN um wichtige Regulatoren des apikalen Sprossmeristems handelt.





**Abb. 21: Die Spezifität der WUS-Bindestellen im Vergleich zu anderen Transkriptionsfaktoren.**

**A** Venn-Diagramm der Überlappung der durch KAN, LFY und WUS gebundenen genomischen Regionen. **B** Hierarchisch geclusterte Heatmap der globalen Bindeprofile (BEDGRAPH) von 29 verschiedenen Transkriptionsfaktoren (aus Heyndrickx et al., 2014). **C** Hierarchisch geclusterte Heatmap der durch KAN, LFY und WUS gemeinsam gebundenen Gene (Überlappung der Binderegionen min. 10%). Von 2508 gemeinsamen Zielgenen sind nur die 1203 Gene mit Regulation ( $\text{padj} < 0,05$ ) durch mindestens einen Faktor dargestellt. **D** Hierarchisch geclusterte Darstellung der Überlappung der Binderegionen aller Trans-

kriptionsfaktoren. Abgebildet ist das Signifikanzniveau der jeweiligen Überlappung (Fisher Exakt Test mit „größer“ Option). **E** wie **D** aber mit Reduktion der Binderegionen auf die zentralen 20bp. **F** Darstellung der ChIP-Seq Signal-Tracks (Signalhöhen gleich skaliert) und identifizierter Bindestellen der Transkriptionsfaktoren WUS (blau), KAN1 (grün) und LFY (rot) für eine genomische Beispielregion. Regionen offenen Chromatins sind grau markiert, Gen-Modelle in schwarz. LFY Bindedaten aus Moyroud et al., 2011 (LFY neu); Transkriptomdaten aus Winter et al. 2011. KAN Bindedaten aus Merelo et al., 2013 (KAN neu); Transkriptomdaten aus Reinhart et al. 2013; WUS neu: Daten dieser Arbeit.

Offenbar wird die Bindung und Regulation von Zielgenen durch Transkriptionsfaktoren sehr komplex reguliert. Mögliche Gründe für die festgestellten Unterschiede in der Genregulation, bei großer Ähnlichkeit in den Bindeprofilen, könnten Modifikationen durch Co-Faktoren, oder die Topologie des Chromatins um die Bindestellen herum sein.

Neben der G-Box, die in rund zwei Drittel aller gebundenen Regionen gefunden wurde, war auch ein GAGA-Motiv signifikant angereichert (Abbildung 10). Dieses Motiv kann von BPC-Transkriptionsfaktoren gebunden werden (Wanke et al., 2011). Um festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen Bindung und Regulation von WUS-Zielgenen mit der Gegenwart von BPCs gibt, wurde ein ChIP-Seq Experiment mit einem Antikörper gegen Klasse I BPCs (*BPCI*, 2 und 3) durchgeführt. Auf diese Weise wurden die BPC-Verteilung im Wildtyp im Vergleich zu einer *bpc1,2,3* Tripelmutante und die Veränderung nach WUS-Induktion gemessen. Im Wildtyp wurden 21 662, nach WUS-Induktion 28 638 durch BPCs gebundene Regionen identifiziert. Eine Analyse überrepräsentierter Sequenzmotive bestätigt die Bindung von GAGA-Motiven, von denen drei Varianten gefunden wurden (Abbildung 22B). Die bereits sehr große Anzahlen an Bindestellen unterschätzt die tatsächliche Anzahl an gebundenen Regionen jedoch noch immer, da auch in der Negativkontrolle (*bpc1,2,3*) ein sehr deutliches Muster zahlreicher *Peaks* detektiert wurde (Abbildung 22A). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um echte Signale auf Grund einer Kreuzreaktion des Antikörpers gegen die Klasse II BPCs. Nach WUS-Induktion verschwinden 16 683 *Peaks* und 27 400 kommen neu hinzu. In einem Umkreis von bis zu 250bp um die WUS-Bindungen herum kommen diese Veränderungen jedoch nicht signifikant häufiger vor als im Rest des Genoms. Sie scheinen demnach nicht durch die WUS-Bindung hervorgerufen worden zu sein. Auch die WUS-Bindung selbst scheint nicht von BPCs abzuhängen. Es gibt keine signifikante Korrelation zwischen der Gegenwart von BPC-*Peaks* in einem Umkreis von bis zu 250bp und den WUS-Bindungen. Daher gibt es keinen Hinweis auf eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Faktoren auf dem genomischen Level.

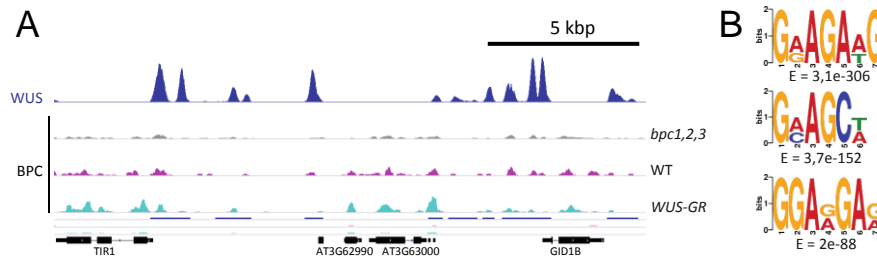


Abb. 22: BPC ChIP-Seq.

**A** Darstellung der BPC ChIP-Seq Signal-Tracks im Vergleich zu WUS (blau) für die genomische Beispielregion aus Abb.21F. WUS-Binderegionen: blau. Gen-Modelle: schwarz. BPC Signal-Tracks sind gleich, WUS Signal-Track ist 0,5x skaliert. BPC Signal in *bpc1,2,3* (grau), in *Col-0* (pink) und nach WUS-Induktion in *WUS-GR* (petrol). **B** Darstellung der MEME-Suite identifizierten Motive mit Erwartungswerten E in den BPC-Bindestellen in *Col-0*.

Betrachtet man jedoch die durch WUS regulierten Zielgene, so werden diese signifikant häufiger durch BPC-Peaks markiert als die übrigen Gene (Abbildung 23). Auf Grund der großen Zahl BPC-markierter Gene (17 732) scheint es sich hierbei jedoch eher um eine Eigenschaft der Gen-Loci zu handeln als um ein instruktives Signal für die WUS-Bindung oder Regulation. Die Richtung der Regulation durch WUS korreliert nicht mit dem Anteil an BPCs im Zielgen.

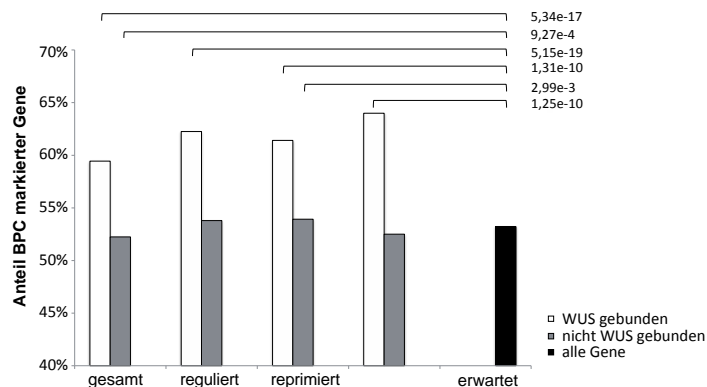


Abb. 23: BPC-Bindungen in WUS-Zielgenen.

Vergleich des Anteils an BPC gebundenen Genen in durch WUS gebundenen (weiß) und nicht gebundenen Genen (grau) mit dem Erwartungswert über alle Gene (schwarz). Signifikanzniveaus ( $\chi^2$ -Test) sind angegeben.

## V. DISKUSSION

Pflanzen wachsen und entwickeln sich postembryonal durch die fortdauernde Aktivität von Stammzellpopulationen an den Spitzen der Sprossachse und der Wurzel, die durch ihre Teilung genügend Zellen als Ressource für die Ausbildung neuer Organe und Strukturen zur Verfügung stellen (Weigel und Jürgens, 2002). Für den Erhalt der Stammzellpopulation im SAM ist die Aktivität des Transkriptionsfaktors WUSCHEL, der im OC unterhalb der Stammzellen exprimiert wird und als Protein über Plasmodesmata in diese einwandert, notwendig (Mayer et al., 1998; Daum et al., 2014; Yadav et al., 2011). Die genaue Funktion von WUS ist dabei größtenteils unbekannt. In einer ersten Studie konnte bereits gezeigt werden, dass WUS spezifische Bindeeigenschaften im Promoter von Zielgenen aufweist und eine Vielzahl von Genen direkt reguliert. Somit stellt es einen wichtigen Knotenpunkt im transkriptionellen Netzwerk der Meristemregulation dar und reguliert mehrere biologische Prozesse (Busch et al., 2010). Für eine eingehendere Analyse der WUS-Funktion war die genomische Auflösung in dieser Arbeit jedoch zu gering.

Aufgabe hier war es daher, die WUS-Funktion möglichst umfassend und hochauflösend abzubilden. Hierzu wurde ein Testsystem entwickelt, das es erlaubte die WUS-Funktion sichtbar zu machen und zu verfolgen. Es wurde verwendet, um die Bindungen von WUS im Genom global zu charakterisieren und epigenetische und transkriptionelle Konsequenzen dieser Interaktionen zu verfolgen. Über die so identifizierten direkt durch WUS regulierten Zielgene ließ sich WUS mit anderen Transkriptionsfaktoren vergleichen und sowohl der molekulare Effekt auf die Zielgene, als auch die Auswirkung auf verschiedene biologische Prozesse global charakterisieren. Der hier vorgestellte Datensatz erweitert durch die Beschreibung des WUS-Effekts auf die Stammzellen des SAM unser Verständnis der Stammzellidentität auf molekularer und transkriptioneller Ebene.

Die Daten legen nahe, dass WUS, wie der Dirigent eines Orchesters, eine große Zahl an Spielern, die Zielgene, spezifisch anspricht und moduliert. Auf diese Weise werden die unterschiedlichen biologischen Prozesse, insbesondere die Hormon-Signaltransduktionswege, harmonisch aufeinander abgestimmt. Die Modulation erfolgt dabei über die Regulation des Histon-Acetylierungszustands der Zielgene. Die WUS-Funktion lässt sich demnach nicht über die Regulation einzelner weniger Gene, sondern über die Summe aller Regulationen erklären.

### V.1 Die *WUS-GR* Linie ist ein geeignetes Modell-System zur Charakterisierung des WUS-Effekts

Nachdem sich die endogene Stammzellpopulation des SAM für gegenwärtige Methoden als nicht zugänglich erwiesen hatte (siehe: Aufreinigung Gewebe-spezifischer Zellkerne für ChIP-Seq), wurde ein Modell-System entwickelt, um *WUS* ektopisch in allen Zellen zu exprimieren und die Funktion chemisch zu induzieren (Die *WUS-GR* Pflanzenlinie: ein Modell zur chemischen Induktion der WUSCHEL Funktion). Somit ließen sich Interaktionen zwischen WUS und Promoterregionen, ohne

einen fehleranfälligen Anreicherungs-Zwischenschritt, hochauflösend nachweisen (Abb.4). Die technisch notwendige ektopische Expression von *WUS* führte jedoch dazu, dass die erhobenen epigenetischen und transkriptionellen Profile nicht den spezifischen Zustand in den Stammzellen, sondern den Durchschnitt aus allen Zellen des Keimlings darstellen. Stammzell-spezifische Effekte könnten einerseits durch den Hintergrund teilweise oder vollständig maskiert worden sein. Andererseits könnte die hohe funktionelle Redundanz zwischen *WUS* und anderen Transkriptionsfaktoren der modernen *WOX*-Klade dazu geführt haben, dass ein Teil des beobachteten Effekts auf die Regulation von *WOX*-abhängigen transkriptionellen Netzwerken zurück geht (Lin et al., 2013; Sarkar et al., 2007). Aus diesem Grund erfolgte die Analyse der *WUS*-Zielgene auf Ebene von Proteinklassen und Familien und nicht einzelnen Genen. Außerdem wurde die Richtung der Regulation nur auf globaler Ebene berücksichtigt, da sie sich im speziellen Kontext der Stammzellen des SAM bei spezifischen Zielgenen deutlich von der globalen Regulation unterscheiden kann (Schuster et al., 2014). Zusätzlich wurde durch den Vergleich mit Expressionsprofilen des SAM sichergestellt, dass diese Regulationen so auch im SAM vorkommen können (Abb.11).

Die *WUS-GR* Pflanzenlinie enthält ein stabiles Transgen zur Expression eines Fusionsproteins aus rot-fluoreszierendem mCherry, dem Glukokortikoid-Rezeptor (GR) und *WUS*. Seine Funktion lässt sich durch Behandlung mit Dexamethason (DEX) induzieren (Abb. 5C,D). Das Fusionsprotein zeigt keinen Hinweis auf Aktivität ohne chemische Induktion (Abb. 5E, 6G), daher ist die *WUS-GR* Linie auch für die Detektion von geringen, z.B. Zelltyp-spezifischen Veränderungen durch *WUS* geeignet. Außerdem ist es somit möglich, die behandelte *WUS-GR* Linie mit behandelten Wildtyp Pflanzen zu vergleichen, um die *WUS*-Funktion zu analysieren.

Die Funktionalität des *WUS*-Fusionsproteins konnte sowohl phänotypisch, als auch transkriptionell nachgewiesen werden. Bei ektopischer, ubiquitärer Expression von *WUS* im Keimling kommt es wie zu erwarten zu einer Arretierung der Entwicklung und schließlich zum Absterben des Keimlings (Lenhard et al., 2002; Yadav et al., 2010). Nach einmaliger lokaler Applikation von DEX auf das Infloreszenzmeristem des wenige Zentimeter großen Primärsprosses, kam es zur Entwicklung von Strukturen, die genau so bereits für die Missexpression von *WUS* durch einen *Activator-tagging Screen* beschrieben wurden (Xu et al., 2005). Neben der typischen Krümmung und Verdrehung der Sprossachse und der Entwicklung einer großen Zahl an zusätzlichen, unstrukturierten Blütenorganen in der primären Infloreszenz, kam es durch *WUS* zur Entstehung von neuen Meristemen, die je nach Position zu neuen Infloreszenzen und Blüten oder Sprossachsen und Blättern führten (Abb. 5). Ob es sich hierbei um eine Reprogrammierung von differenziertem in meristematisches Gewebe handelt, oder ob *WUS* ruhende Stammzellpopulationen aktiviert hat, ist unklar, kann aber mit diesem Modell-System überprüft werden (Sugimoto et al., 2011). Im Gegensatz zu den bereits genannten phänotypischen Veränderungen, die sich im Zeitraum von wenigen Wochen entwickeln, kommt es bereits nach einem Tag zu einer Vergrößerung der *CLV3* Expressionsdomäne und Verstärkung der Ex-

pression, die innerhalb der nächsten Tage zu einer Vergrößerung des SAM führt (Abb. 6). Diese Vergrößerung geht einher mit einer größeren Zahl an kleineren Zellen, die wahrscheinlich durch vermehrte Zellteilung entstanden sind. Diese Ergebnisse entsprechen früheren Erkenntnissen, wonach die ubiquitäre Expression von *WUS* im SAM zu einer Verstärkung und Ausdehnung der *CLV3* Expression durch Dedifferenzierung von Zellen der PZ in Zellen der CZ führt (Yadav et al., 2010). Zusätzlich konnte in dem vorliegenden Fall jedoch auch eine Zunahme der Meristemgröße und eine erhöhte Zellteilungsrate der Zellen der PZ und der CZ festgestellt werden, wie sie bereits für die Überexpression von *WUS* im SAM durch die Reduktion von *CLV3* beschrieben wurde (Reddy und Meyerowitz, 2005). Die vorliegende *WUS-GR* Linie scheint demnach die Vorgänge im Meristem bei Überexpression des endogenen *WUS* noch besser nachstellen zu können als die Linie aus Yadav et al., (2010).

Auch auf der Transkriptom-Ebene ist die neue Linie sehr potent. Bereits nach wenigen Stunden Induktion mit DEX weist das Transkriptom eine starke Veränderung entsprechend einer *WUS*-Überexpression auf (Hauptkomponente 1 in Abb.7). Der Effekt ist dabei wesentlich stärker als in den bisher verwendeten Überexpressionslinien (Leibfried et al., 2005; Busch et al., 2010). Sie ist damit besser als frühere Varianten geeignet, um auch schwächere Regulationen zu detektieren.

Die hier vorgestellte *WUS-GR* Pflanzenlinie erlaubt die chemische Induktion der *WUS*-Funktion in allen Zellen der Pflanzen innerhalb kurzer Zeit. Die Funktion des Fusionsproteins entspricht dabei der des endogenen *WUS*, es lässt sich jedoch zusätzlich optisch verfolgen. Somit kann einerseits der Erfolg der chemischen Induktion sichergestellt und andererseits das Fusionsprotein spezifisch ohne Kreuzreaktionen gegen ähnliche Epitope immunopräzipitiert werden. Außerdem lassen sich die induzierten Effekte in eine zeitliche Abfolge stellen. Diese Eigenschaften machen die *WUS-GR* Linie zum bislang besten Modell-System für die globale Untersuchung der *WUS*-Funktion. Durch Kombination mit Reporter-Linien lässt sie sich für weitergehende Fragestellungen nutzen.

## **V.2 WUS interagiert Sequenz-spezifisch mit einer Vielzahl an offenen Promoterbereichen nahe des Transkriptionsstarts der Zielgene**

Die Identifikation der Interaktionen von *WUS* mit genomischer DNA durch ChIP-Seq ergab 5874 Bindestellen im Promoter von 4515 Zielgenen (Abb. 8). Sie befinden sich fast ausschließlich in DNaseI sensitiven Regionen, d.h. in Bereichen mit offen zugänglichem Chromatin, sehr nahe des Transkriptionsstarts der Zielgene (Abb. 8 D,E). Zwei Drittel (67,48%) der Interaktionen lassen sich durch die Gegenwart eines G-Box Sequenzmotivs oder einer Variante erklären (Abb.10). Dieses Motiv wurde bereits früher als *WUS*-Bindemotiv identifiziert und konnte hier unabhängig verifiziert werden (Busch et al., 2010). Ein zweites *WUS*-Bindemotiv, das im zweiten Intron von *AGAMOUS* durch *WUS* gebunden wird, konnte nicht gefunden werden (Lohmann et al., 2001). Dies könnte technische Ursachen haben, da TA-reiche Motive in Promoterbereichen von *Arabidopsis* über-

repräsentiert sind und daher schwieriger als signifikant angereichert gewertet werden. Es könnte aber auch biologische Gründe haben, da diese schwächere Interaktion während der Blütenbildung in Abhängigkeit von dem Transkriptionsfaktor LEAFY stattfindet (Busch et al., 2010; Lohmann et al., 2001). Daher könnte es sich um eine Interaktion handeln, die spezifisch für die Blütenentwicklung ist und nichts mit dem Erhalt der Stammzellidentität zu tun hat.

Die identifizierten Binderegionen und Zielgene bestätigen viele bereits bekannte Bindestellen und Zielgene, wie *ARR7*, *CLV1*, *KAN1*, *KAN2*, *AS2* und *YAB3* (Abb. 9; Leibfried et al., 2005; Busch et al., 2010; Yadav et al., 2013). Einzelne publizierte Zielgene konnten jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies könnte, wie im Fall von *AG*, an der Verwendung eines unpassenden Entwicklungsstadiums der Pflanzen liegen. Der Locus des homöotischen Blütengens weist im Keimling starke H3K27me3 Signale auf, die für eine stabile Repression sprechen und eine Bindung verhindern (Abb. 9). Andererseits kann die fehlende zelluläre Auflösung dazu führen, dass spezifische Interaktionen in nur wenigen Zellen, wie die mit dem Promoter von *CLV3* in den Stammzellen, nicht detektiert werden können (Yadav et al., 2011).

Insgesamt entspricht dieser ChIP-Seq Datensatz sehr gut bisherigen Erkenntnissen zu Bindeeigenschaften, Positionen und Zielgenen, wie sie bereits in einem vorangegangenen Experiment zur globalen Identifikation der WUS-Bindeeigenschaften identifiziert wurden (Busch et al., 2010). Er übertrifft diesen in Bezug auf räumliche Auflösung der Bindungen und der Identifikation von Bindestellen deutlich und ist somit in der Lage, wichtige neue Erkenntnisse zu liefern. Zusätzlich wird die Relevanz dieser Daten durch die Expressionsmuster und das Verhalten bei Veränderung der WUS-Level im SAM unterstützt (Abb. 11B,C). Ein großer Teil der identifizierten WUS-Zielgene weist beim Vergleich mit Expressionsdaten aus dem SAM bei Anheben oder Absenken der WUS-Level, eine deutliche Regulierbarkeit durch WUS auf (Busch et al., 2010). Außerdem sind signifikant mehr Zielgene in den Regionen des SAM entsprechend Gewebe-spezifischer Expressionsprofile exprimiert, die zur Regulation durch WUS passen (Yadav et al., 2014). Demnach darf davon ausgegangen werden, dass dieser ChIP-Seq Datensatz die Bindeeigenschaften von WUS adäquat abbildet.

Aus diesem Grund konnte hier erstmals der Frage nachgegangen werden, inwieweit sich die WUS Bindeeigenschaften und die daraus resultierenden Genregulationseigenschaften auf globaler Ebene von anderen Transkriptionsfaktoren unterscheiden. Vergleicht man die globalen Bindesignaturen von WUS mit denen von anderen Transkriptionsfaktoren, so ähneln sie sich überraschend stark (Abb. 21). Die Überlappung an Bindestellen geht dabei nicht auf eine unzureichende Auflösung der Regionen zurück, da selbst zentrale Bereiche signifikant überlappen (Abb. 21 D,E). Diese Eigenschaft ist jedoch nicht spezifisch für WUS, sondern ergibt sich auch für den Vergleich der anderen Transkriptionsfaktoren untereinander und scheint damit allgemein gültig zu sein. Bei diesem Vergleich fällt auch auf, dass der neue WUS-Datensatz dem Vorherigen relativ wenig ähnelt, da er wesentlich umfangreicher und hochauflösender ist (Busch et al., 2010). Sortiert man die Transkriptionsfaktoren nach Ähnlichkeit

ihrer globalen Bindeprofile, so befindet sich WUS in einer Gruppe von Faktoren, wie PIFs, AP2 und BES1 die Varianten eines G-Box Motivs binden (Zhang et al., 2013; Nole-Wilson und Krizek 2000; Yu et al., 2011). Die Ähnlichkeit der Profile lässt sich hier also über sehr ähnliche Bindeaffinitäten erklären. Für andere Faktoren, wie LFY und KAN1, die mit deutlich abweichenden DNA-Sequenzen interagieren, muss es allerdings eine andere Erklärung geben (Winter et al., 2011, Merelo et al., 2013). Die Bindsignaturen weisen daher auch leichte Abweichungen in der Position der *Peaks* innerhalb der Binderegionen auf (Abb. 21F). Außerdem haben die Faktoren auch deutlich unterschiedliche Affinitäten zu den einzelnen Binderegionen. Dies könnte erklären, weshalb jeder Faktor nur in der Lage ist, die Expression eines distinkten Teils der gemeinsam im Promoter gebundenen Zielgene zu regulieren (Abb. 21C).

WUS interagiert also über eine spezifische Bindesequenz mit einer großen Zahl an Promotoren, die offen zugänglich sind. Allerdings führt nicht jede dieser Interaktionen zu einer Veränderung in der Genexpression (Abb. 8F). In dieser Hinsicht ähnelt WUS vielen anderen Transkriptionsfaktoren. Mark Biggin hat, auf Grund sehr ähnlicher Ergebnisse für Transkriptionsfaktoren aus *Drosophila* und anderen Tieren, ein Modell entwickelt, das die Eigenschaften von Transkriptionsfaktoren zusammenfasst (Biggin, 2011). Auch er erkennt, dass die meisten Transkriptionsfaktoren sehr viele redundante Bindungen eingehen. Die meisten Interaktionen sind jedoch schwach und beruhen v.a. auf der offenen Zugänglichkeit der Regionen. Daher werden, bei entsprechend weniger strikten Einstellungen, exponentiell mehr Binderegionen detektiert, wie es auch im Vergleich der beiden WUS ChIP-Seq Replikate der Fall ist (Abb. 8C). Diese schwachen Interaktionen sind jedoch nicht ausreichend, um eine transkriptionelle Regulation zu bewirken. Wie stark und häufig ein Promoter gebunden werden muss, um den jeweiligen Locus zu regulieren, ist unklar. Biggin schlägt ein kontinuierliches transkriptionelles Netzwerk vor, in dem sich die unterschiedlich starken Interaktionen der verschiedenen Transkriptionsfaktoren in den jeweiligen Promoterbereichen untereinander summieren und so eine sehr spezifische, quantitative Genexpression hervorrufen. Auch weniger starke Bindungen können so zu einer Genregulation beitragen, während selbst stärkere nicht immer dazu führen müssen. Daher wurde für die Identifikation der WUS-Zielgene neben der Interaktion mit dem Promoter auch die Expressionsveränderung durch die WUS-Bindung berücksichtigt (Abb. 11A).

### **V.3 WUS reguliert seine Zielgene über die Anpassung der Histon-Acetylierung**

Nachdem das Bindeprofil als repräsentative Abbildung der WUS-Bindungen bestätigt werden konnte, wurde als nächstes die damit einhergehende Wirkung auf die jeweiligen Zielgene untersucht. Um den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Eigenschaften eines kontinuierlichen transkriptionellen Netzwerks Rechnung zu tragen, wurde auf das Setzen von willkürlichen Schwellenwerten verzichtet. Die Expressions- und Bindedaten wurden in einer Metaanalyse kombiniert und Zielgene über eine hierarchische Clusteranalyse identifiziert (Abb.11A). Auf diese Weise konnten 1496 direkt durch



WUS reprimierte und 1497 direkt aktivierte Gene identifiziert werden. Außerdem gibt es ein Cluster von 1006 direkt gebundenen Genen, die keine deutliche Regulation aufweisen. Da diese Gruppe jedoch verschiedene bekannte und vermutete WUS-Zielgene, wie z.B. *CLV1*, *TPL* und *ARR15* enthält, handelt es sich hierbei wahrscheinlich ebenfalls um echte Zielgene, deren Regulation jedoch in spezifischen Geweben oder Entwicklungsstadien erfolgt (Busch et al., 2010; Leibfried et al., 2005). Diese Analyse bestätigt also die duale Funktion von WUS als Repressor und Aktivator (Lohmann et al., 2001; Leibfried et al., 2005; Busch et al., 2010).

### V.3.1 WUS als Repressor

Ein großer Teil der WUS-Zielgene wird innerhalb kurzer Zeit nach WUS-Induktion, auch in Gegenwart des Translationsinhibitors Cycloheximid, reprimiert (Abb.11 A, 12, 14). Die starke Korrelation mit der WUS-Bindung im Promoter dieser Gene spricht stark für die Funktion als Transkriptionsrepressor. Hierzu passt, dass die Bindungen fast ausschließlich in offen zugänglichen Promoterbereichen in unmittelbarer Nähe zum Transkriptionsstart erfolgen (Abb.8 D,E). Das frühe Eintreten der Repression, auch in Gegenwart von Cycloheximid, und ihre Stärke weisen auf einen direkten, aktiven Vorgang hin. Verschiedene Erkenntnisse sprechen dafür, dass es sich hierbei um die Verringerung der Histon-Acetylierung mit Hilfe eines Histon-Deacetylase (HDAC) Komplexes handelt.

Für die Aufrechterhaltung einer Stammzellpopulation benötigt WUS die WUS-Box, über die auch eine direkte Protein-Protein Interaktion mit Co-Repressoren der TPL/TPR Familie erfolgen kann (Ikeda et al., 2009; Kieffer et al., 2006). Diese erfüllen ihre Funktion zumindest teilweise durch die Rekrutierung von HDA19, einer HDAC (Krogan et al., 2012; Pi et al., 2015). Da jedoch keine physische Interaktion zwischen TPL und HDA19 detektiert werden konnte, wird angenommen, dass zusätzliche Faktoren diese Interaktion vermitteln (Causier et al., 2012). Dabei könnte es sich um die Transkriptionsfaktoren der HAIRY MERISTEM (HAM) Familie handeln. Sie interagieren mit einem anderen Proteinabschnitt in WUS und spielen eine wichtige Rolle bei der Stammzellproliferation im SAM (Zhou et al., 2015). Ein Homolog aus *Brassica napus*, BnSCL1, kann physisch mit der HDA19 aus *Arabidopsis* interagieren (Gao et al., 2004). Die HDAC Aktivität ist notwendig für ein funktionales Meristem (Kieffer et al., 2006). Außerdem konnte gezeigt werden, dass WOX5 sein Zielgen *CDF4* mit Hilfe der HDA19 reprimiert (Pi et al., 2015). Es liegt daher nahe, dass WUS seine Zielgene reprimiert, indem es einen Komplex aus TPL/TPR, HAM und HDA19 in der Nähe des Transkriptionsstarts bildet. Die HDAC-Aktivität würde dann zu einer epigenetischen Repression der Loci führen. Die hier vorgelegten Ergebnisse unterstützen diese Hypothese.

Nach WUS-Induktion kommt es zeitgleich zu einer deutlichen globalen Abnahme der Histon-Acetylierung bei den direkt reprimierten Zielgenen (Abb.11). Diese Deacetylierung ist auch in der Detailansicht erkennbar (Abb. 12 und 14) und korreliert räumlich signifikant mit der WUS-Bindung (Abb.13). Der Mindestabstand von etwa 400bp zwischen der WUS-Bindestelle und dem Beginn des deacetylierten Bereichs spricht für die Bildung eines molekularen Komplexes, der seine Aktivität

richtungsspezifisch im Transkript kodierenden Bereich ausübt. Dass diese Aktivität verantwortlich für die Repression der Zielgene ist, zeigt sich bei Behandlung mit einem HDAC-Inhibitor. Von den signifikant reprimierten Genen werden die WUS-Zielgene, mit 86,8% zum größten Teil, deutlich mehr de-reprimiert als der Rest (Abb. 14C).

Hier konnte somit erstmals gezeigt werden, dass die für den Stammzellerhalt wichtige Repressor-Funktion von WUS global über die Deacetylierung der Zielgene, mit Hilfe einer HDAC, erfolgt. Wie angesprochen, rekrutiert WUS hierzu wahrscheinlich eine Art Adapterkomplex aus TPL/TPR und HAM, der die HDA19 rekrutiert. Die Tatsache, dass eine direkte Fusion von HDA19 an funktionsloses WUS dessen Aktivität in der Stammzellregulation nicht wieder herstellen kann (Abb. 15) und dass die induzierten Deacetylierungen sich über weitere Bereiche der kodierenden Region erstrecken (Abb. 13B), spricht für eine hohe Mobilität der HDAC, die sich wahrscheinlich aus dem Komplex lösen muss, um ihre Funktion zu erfüllen.

Dieser Komplex wird möglicherweise durch Faktoren in der unmittelbaren Umgebung unterstützt. In der Nähe der WUS-Bindestellen finden sich Motive für die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der TCP und BPC Familien (Abb. 10). Von TCPs ist bekannt, dass sie über das TCP INTERACTOR CONTAINING EAR PROTEIN1 (TIE1) mit TPL/TPR interagieren können (Tao et al., 2013). Auch BPCs, die eine regulierende Rolle für die Meristemgröße spielen, können epigenetische Repression, allerdings über den PRC2 Komplex, vermitteln (Simonini und Kater, 2014; Hecker et al., 2015). Für eine derartig stabile Form der epigenetischen Abschaltung von Zielgenen durch WUS gibt es, innerhalb der kurzen untersuchten Zeitspanne, keine Hinweise (Abb. 11A). Es ist ebenso unwahrscheinlich, dass WUS BPCs rekrutiert. Sie scheinen vielmehr grundsätzlich in Promoterbereichen regulierbarer Gene vorzukommen (Abb. 22 und 23).

Die Bedeutung der aktiven Repression durch WUS wird deutlich, wenn man den Gewebefluss im SAM berücksichtigt. WUS wandert in die Stammzellen und reprimiert dort direkt Differenzierungsprogramme, die automatisch aktiviert werden, sobald die Zellen aus der Stammzelldomäne verdrängt werden. Hierzu ist es notwendig, dass die Programme nicht langfristig abgeschaltet werden. In diesem Modell wäre das Standardprogramm der Zellen sich zu differenzieren und die Repression ein instruktives Signal für die Stammzellidentität.

### **V.3.2 WUS als Aktivator**

Neben der Repression konnte hier auch die bekannte Funktion von WUS als Aktivator der Genexpression bestätigt werden (Lohmann et al., 2001; Busch et al., 2010). Obwohl etwa gleich viele Gene direkt durch WUS aktiviert wie reprimiert werden, ist unklar, ob sie überhaupt für die Stammzellregulation von Bedeutung sind (Abb. 11A). Die Transaktivationsdomäne von WUS scheint für die Funktion im SAM unerheblich zu sein, lediglich für die Aktivierung von AG wird sie benötigt (Ikeda et al., 2005). Im Kontext der Stammzellregulation reicht eine künstliche SDRX-Domäne, die

zur Interaktion mit TPL/TPR dient, um ein sonst funktionsloses WUS wieder aktiv zu machen. Dennoch scheint es unwahrscheinlich, dass es sich bei der großen Zahl an aktivierten Genen um Artefakte handelt. Eine Erklärung könnte die Behandlung mit HDAC-Inhibitor liefern. Nicht nur die direkt reprimierten Zielgene werden de-reprimiert, sondern auch die direkt aktivierten Zielgene de-aktiviert (Abb. 14A). Sowohl Repression, als auch Aktivierung scheinen demnach HDAC-vermittelt zu sein. Diese Erkenntnis ist keineswegs neu, wie in einem Übersichtsartikel von Catharine Smith dargestellt wird (2008). In menschlichen T-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass HDACs sogar bevorzugt in aktiv transkribierten Regionen vorgefunden werden und für die Aktivität der Loci mit verantwortlich sind (Wang et al., 2009). Die Autoren argumentieren, dass die Hauptaufgabe der HDACs darin besteht, den Acetylierungszustand nach aktiver Transkription zurückzusetzen, um eine fortlaufend aktive Transkription zu gewährleisten. In diesem Fall würde WUS mit Hilfe des gleichen Komplexes wie für die Repression Zielgene aktivieren. Die Entscheidung über Repression oder Aktivierung wäre dann vom allgemeinen transkriptionellen Zustand jedes einzelnen Locus abhängig. WUS würde lediglich den Trend amplifizieren. Diese Wirkweise passt sehr gut zum Modell eines kontinuierlichen WUS-abhängigen transkriptionellen Netzwerks, da WUS hier nicht als Schalter, sondern als Modulator wirkt, der die Expressionslevel harmonisiert und nicht einzelne Gene ein- und andere abschaltet.

#### **V.4 WUS als „Dirigent“ des SAM**

Stellt man sich die Summe der im Meristem ablaufenden Prozesse als eine Symphonie vor, so wäre WUS deren Dirigent. Während die Partitur durch den Komponisten vorgegeben wird und jeder Musiker weiß, was er spielen muss, ist es Aufgabe des Dirigenten die einzelnen Musiker zu synchronisieren und in ihrer Lautstärke und im Ausdruck zu harmonisieren. Im Falle des SAM wäre die Partitur der genetische Code der einzelnen Zellen. Ihn umzusetzen, damit eine individuelle Melodie entsteht, ist Aufgabe der einzelnen Musiker, oder analog der Transkriptionsfaktoren. Töne entstehen jedoch erst durch den passenden Einsatz der Instrumente, die in diesem Bild der Summe der durch die Transkriptionsfaktoren regulierten Gene entsprechen.

Betrachtet man die molekularen Funktionen der durch WUS regulierten Zielgene, fällt der große Anteil an DNA-bindenden Faktoren und Kinasen auf (Abb.16). WUS wirkt somit zum großen Teil über die Regulation von anderen Transkriptionsfaktoren und Signaltransduktionskomponenten und kaum direkt auf metabolische Enzyme. Demnach ist WUS der Ausgangspunkt eines sich schnell verzweigenden transkriptionellen Netzwerks, was gut zur Rolle als Schlüsselregulator der Stammzellnische passt.

Nachdem WUS also auf dem Podium vor dem Orchester platziert werden konnte, stellt sich die Frage, was WUS von dort aus dirigiert. Wie die einzelnen Musiker im Orchester sich in verschiedene hierarchische Gruppen, gemäß ihrer Instrumente, gliedern lassen, so werden auch die biologischen

Prozesse, an denen ein Faktor beteiligt ist, in hierarchische Ontologien eingeordnet. Eine statistische Analyse der den WUS-Zielgenen zugeordneten Gen Ontologien (GO) zeigt, dass WUS v.a. auf zelluläre Prozesse, wie Zelldifferenzierung, Zellkommunikation und Signaltransduktion sowie zu einem Teil auf Prozesse des Kohlenhydratmetabolismus direkt einwirkt (Abb. 16). Diese Prozesse werden dabei größtenteils durch WUS gleichzeitig sowohl aktiviert, als auch reprimiert (Abb. 17), was zur oben beschriebenen Hypothese passt, dass WUS über den gleichen molekularen Komplex die Expression der Zielgene in beide Richtungen moduliert. Lediglich die Prozesse des Kohlenhydratmetabolismus werden bevorzugt aktiviert. Bei entsprechenden Schwellenwerten für die GO-Analyse werden auf Grund der geringeren Anzahl an Elementen in dieser Gruppe für variabel regulierte Zielgene weniger Kategorien dargestellt. Die Kategorien Tod und Zelltod bei den reprimierten Zielgenen enthalten Gene, deren Funktionsverlust zum Tod der Pflanzen führen. Es handelt sich dabei nicht um aktive Prozesse.

Die bei dieser groben GO-Analyse identifizierten Kategorien bestätigen bereits bekannten Funktionen von WUS. Über die direkte Repression von *ARR7* im Meristem reguliert WUS eine Komponente der Cytokinin-Signaltransduktion (Leibfried et al., 2005). In die Zellkommunikation greift WUS direkt ein, indem es *CLV1* den Rezeptor für das von den Stammzellen sekretierte CLV3-Peptid im Bereich des OC reprimiert (Busch et al., 2010). Außerdem reprimiert WUS direkt die Expression von verschiedenen Differenzierungsfaktoren wie *KAN1*, *KAN2*, *AS2* und *YAB3* (Yadav et al., 2013). Lediglich für die direkte Regulation des Kohlenhydratmetabolismus durch WUS gibt es bislang keine gesicherten Belege. Allerdings kann die Zugabe von Zucker ins Medium den Mutantenphänotyp von *wox9*, einem positiven Regulator von *WUS*, durch Stimulieren des Eintritts in den Zellzyklus vollständig retten (Wu et al., 2005). Zucker scheint demnach eine wichtige Signalfunktion im SAM zu spielen.

Um ein besseres Verständnis von den direkt durch WUS regulierten biologischen Prozessen zu bekommen, wurde die GO-Analyse mit größerer Auflösung wiederholt. Listet man die einzelnen Kategorien entsprechend ihres Signifikanzniveaus auf, so fällt auf, dass Hormon-Signaltransduktionsprozesse unter allen WUS-Zielgenen, unabhängig von der Richtung der Regulation, am deutlichsten überrepräsentiert sind (Abb. 17). WUS scheint also direkt in die Wahrnehmung von verschiedenen Pflanzenhormonen einzugreifen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die transkriptionellen Veränderungen durch WUS-Induktion mit denen nach Hormon-Behandlung in einer Hauptkomponentenanalyse miteinander verglichen (Abb.18). Die relativ geringe, durch die ersten Hauptkomponenten abgebildete Varianz macht deutlich, dass WUS neben der Hormon-Signaltransduktion auch andere Prozesse regulieren muss. Dennoch fällt auf, wie gut der induzierte WUS-Effekt zu den Hormon-Behandlungen passt. Bei Betrachtung der ersten beiden Dimensionen der Analyse liegen die Einzelexperimente entweder auf einer Achse mit den WUS-Experimenten oder auf einer Achse im rechten Winkel dazu. Die Veränderungen im Transkriptom entsprechen demnach, mehr oder weniger ausge-

prägt, der durch WUS-Induktion oder laufen ihr entgegen. In der dritten Dimension wird jedoch deutlich, dass WUS auch transkriptionelle Veränderungen jenseits von Hormon-Signaltransduktion hervorruft.

Die Ergebnisse geben somit Anlass, die einzelnen Signaltransduktionswege im Detail auf Regulation durch WUS zu untersuchen. Dabei wird deutlich, dass WUS einen Großteil der Schlüsselkomponenten der einzelnen Signalwege gleichzeitig direkt moduliert und somit den Signalweg als Ganzes reguliert (Abb. 12, 19). Auch wenn eine Komponente durch die redundante Funktion mehrerer Gene abgedeckt werden kann, so werden meistens mehrere Gene der Familie von WUS direkt reguliert. Die gleichzeitige Regulation der meisten Schaltstellen der verschiedenen Signalwege mag erklären, weshalb WUS so viele Zielgene hat (Abb. 11). Aber was ist der Vorteil von vielen, teils sehr geringen, Modulationen gegenüber der direkten Regulation eines Schlüsselmoduls?

Von Stoffwechselwegen ist bekannt, dass sie meistens über die gleichzeitige Regulation von mehreren enzymatischen Schritten und nicht eines einzelnen geschwindigkeitsbestimmenden Schritts reguliert werden (Fell, 1997). Sie sind, ebenso wie transkriptionelle Netzwerke, durch verschiedene Rückkopplungsschleifen auf Homöostase eingestellt und somit stark gegen äußere Veränderungen gepuffert. Nur die gleichzeitige Regulation an verschiedenen Schaltstellen führt zu einem neuen Gleichgewicht (Fell, 1997). Mit der gleichen Logik würde WUS, selbst über schwache Modulationen der verschiedenen Schaltstellen der Signaltransduktionswege, die Empfindlichkeit der Zellen auf die unterschiedlichen Hormone deutlich beeinflussen. Entsprechend der Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse hat WUS einen tendenziell positiven Effekt auf die Signaltransduktion von Jasmonsäure, Cytokinin und Gibberellinsäure und einen negativen Effekt auf Abscisinsäure und Auxin (Abb. 18). Die mögliche Bedeutung der Regulation der einzelnen Signaltransduktionswege für das SAM wird im Anschluss einzeln besprochen.

Eine direkte Regulation der Cytokinin-Signaltransduktion durch WUS war, wie in der Einleitung ausführlich dargelegt, bereits bekannt und konnte hier erneut bestätigt werden. WUS unterstützt die Signaltransduktion durch direkte Repression verschiedener negativer Regulatoren der Typ-B *ARRs* (Abb. 19; Leibfried et al., 2005). Hier konnte zusätzlich gezeigt werden, dass auch Cytokinin-Rezeptoren direkt durch WUS reguliert und der Promoter eines *AHPs* gebunden werden können. Die Typ-A *ARRs* werden jedoch nur indirekt reguliert, weshalb dieser Signaltransduktionsweg insgesamt keine statistisch signifikante Überrepräsentierung an WUS-Regulation aufweist (Abb.19). Cytokinin ist einerseits ein positiver Faktor für die Expression von WUS, andererseits ist es essentiell für die Aufrechterhaltung der SAM-Aktivität indem es die Zellteilungsrate positiv reguliert (Gordon et al., 2009; Kurakawa et al., 2007; Riou-Khamlichi 1999). Die tendenziell gleiche Richtung der Veränderung des Transkriptoms nach Cytokinin- und WUS-Behandlung unterstützt die Vorstellung einer positiven Regulation der Cytokinin-Signaltransduktion durch WUS (Abb.18).

Die Gibberellin-Signaltransduktion, die ebenfalls in der Einleitung bereits beschrieben wurde, wird auf allen Ebenen, mit Ausnahme der F-Box *SLY1* (in Mais *GID2*), direkt durch WUS reguliert (Abb. 19). Auch hier weisen Transkriptomanalysen auf einen positiven Effekt durch WUS hin (Abb. 18). Die Bedeutung von Gibberellin für das SAM ist jedoch nicht so eindeutig wie für Cytokinin. Es ist wichtig für die Blühinduktion, Samenkeimung und Zellstreckung (Yamaguchi et al., 2014; Vanstraelen und Benkova, 2012; Davière und Achard, 2013). In Infloreszenzmeristemen blockieren die DELLA-Proteine die Bindestellen für TCP-Transkriptionsfaktoren in den Promotoren von Zellzyklus Genen. Durch das Gibberellin-Signal werden sie abgebaut und der Zell-Zyklus kann voranschreiten (Davière et al., 2014). Andererseits ist konstitutive Aktivität der Gibberellin-Signaltransduktion abträglich für die SAM Aktivität, weshalb die GA-Biosynthese dort durch STM reprimiert wird (Hay et al., 2002). Die Kontrolle über die Wahrnehmung von Gibberellin in den unterschiedlichen Zellen des SAM scheint daher von großer Bedeutung zu sein.

Zumindest bei der Samenkeimung ist das Hormon Abscisinsäure (ABA) der physiologische Gegenspieler von Gibberellin (Razem et al., 2006). ABA ist ein notwendiges Pflanzenhormon, das als Reaktion auf physiologische Stresszustände, wie Trockenheit, Hitze, Kälte oder Salinität, produziert wird und zur Aktivierung von Stresstoleranzprogrammen führt (Zhu, 2002). Die transkriptionelle Antwort erfolgt durch ABA RESPONSIVE ELEMENT-BINDING FACTORS (ABF), die durch Kinasen der SNF1-RELATED PROTEIN KINASE2 (SnRK2) Familie phosphoryliert werden müssen. Ohne ABA werden die SnRK2s durch Protein-Phosphatasen des Typs 2 (PP2C) inhibiert. In der Zelle wird ABA durch die Rezeptoren PYRABACTIN RESISTANCE1 (PYR1) und PYR1-like1-13 (PLY1-13) gebunden, die daraufhin die Aktivität der PP2Cs inhibieren (Ng et al., 2014). WUS kann auf alle diese Elemente direkt transkriptionell einwirken (Abb.19). Als Reaktion auf Stressbedingungen ist die ABA-Signaltransduktion für Pflanzen überlebensnotwendig. Eine massive transkriptionelle Veränderung, die sich deutlich von der Reaktion auf eine WUS-Induktion unterscheidet, kann bereits nach kurzer Zeit nachgewiesen werden (Abb. 18). Aufgabe von WUS könnte es daher sein, diese starke Reprogrammierung in den Stammzellen zu unterbinden. In Reis führt ABA zu einer Hemmung der Zellteilung im Spross und damit zu verringertem Größenwachstum (Meguro und Sato, 2014). In Meristemen kann ABA eine Dormanz hervorrufen, wobei die Meristem-Aktivität eingestellt wird, die funktionellen Eigenschaften aber erhalten bleiben (Lopez-Molina et al., 2001). In der Wurzel konnte gezeigt werden, dass ABA auch eine wichtige positive Funktion in der Stammzellregulation ausübt. Über den Erhalt der Dormanz des Ruhenden Zentrums, dem Organisator des Wurzelmeristems, und die Unterbindung der Differenzierung der Stammzellen in der Wurzelhaube, unterstützt ABA auf zweifache Weise den Erhalt des Wurzelmeristems (Zhang et al., 2010). Eine analoge Funktion wäre auch für das SAM denkbar.

Das gasförmige Ethen (auch Ethylen) ist an einer Vielzahl an Wachstums- und Entwicklungsprozessen der Pflanze beteiligt, v.a. jedoch an Seneszenz, Fruchtreife und Abszission (Shakeel et al., 2013). Es

wird durch membranständige Ethylen-Rezeptoren (ERT) im endoplasmatischen Retikulum gebunden, die zusammen mit der Raf-like Serin/Threonin Kinase CTR1 das Signal, wahrscheinlich durch eine MAPK Kaskade, an das ebenfalls membrangebundene ETHYLEN-INSENSITIVE2 (EIN2) weiterleiten. EIN2 aktiviert die Transkriptionsfaktoren der ETHYLEN-INSENSITIVE3 (EIN3)/EIN3-like (EIL) Familie, die die Transkription von ETHYLEN RESPONSE FACTORS (ERF) aktivieren (Shakeel et al., 2013). EIN3 wird zusätzlich über die Aktivität der EIN3-BINDING F-BOX PROTEINE1 und 2 (EBF1/2) reguliert (An et al., 2010). WUS kann v.a. die Expression von *CTR1* und *EIN2*, sowie der F-Box Proteine *EBF1/2* direkt regulieren (Abb. 19). Da für diese Studie keine Transkriptomdaten nach Ethenbehandlung zur Verfügung standen, ist ein Vergleich mit der WUS-Induktion nicht möglich. Ob Ethen für die Aktivität des SAM eine Bedeutung hat ist noch unklar, in der Birke (*Betula pendula*) ist es jedoch notwendig für die Abschaltung der SAM-Aktivität als Anpassung zur Überwinterung (Ruonala et al., 2006). In einer anderen Stammzellnische, dem Kambium, kann Ethen positiv auf die Zellteilung in der Vaskulatur wirken (Etchells et al., 2012).

Brassinosteroid, ein polyhydroxyliertes Derivat von 5- $\alpha$ -Cholestan, ist ein Pflanzenhormon, das eine Vielzahl an verschiedenen Wachstums- und Entwicklungsprozessen, wie Längenwachstum, Zellteilung, Seneszenz und Stresstoleranz, beeinflusst (Clouse, 2011). Es wird in *Arabidopsis* durch den Rezeptor BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 (BRI1) wahrgenommen. Die Plasmamembran lokalisierte Rezeptorkinase bindet über die extrazelluläre Domäne Brassinosteroid und wird dadurch aktiviert. Die Kinasedomäne phosphoryliert daraufhin den negativen Regulator BRI1 KINASE INHIBITOR1 (BKI1) und entlässt ihn von der Plasmamembran. Das nun freie BRI1 assoziiert mit BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1 (BAK1), was zu einer gegenseitigen Phosphorylierung der beiden Kinasen führt. Daraufhin werden BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASEN (BSK) phosphoryliert und können die Plasmamembran verlassen. Sie aktivieren BRI1 SUPPRESSOR1 (BSU1), das die BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE2 (BIN2) Kinase dephosphoryliert und dadurch inaktiviert. Die beiden Transkriptionsfaktoren BRASSINAZOLE-RESISTANT1 und 2 (BZR1/2) können daraufhin akkumulieren und ihre Zielgene aktivieren (Clouse, 2011). Mit Ausnahme von BSK2, BSU1 und BZR1 können sämtliche Komponenten der Brassinosteroid-Signaltransduktion direkt in ihrer Expression durch WUS reguliert werden (Abb. 19). Im SAM ist Brassinosteroid v.a. für die Etablierung einer Begrenzungszone mit verringerter Zellteilungsrate zwischen Meristem und Primordien verantwortlich (Breuil-Broyer et al., 2004). Durch die Aktivierung von BZR1 führt es zur Repression von Begrenzungszone-spezifischen Transkriptionsfaktoren (Gendron et al., 2012). Das spezifische Expressionsmuster von BZR1 im Zentrum des SAM und der Primordien wird zusätzlich unterstützt durch ein lokales Brassinosteroid-Minimum in der Begrenzungszone. Es wird durch eine negative Rückkopplungsschleife zwischen dem direkt durch Brassinosteroid aktivierten Transkriptionsfaktor *LATERAL ORGAN BOUNDARIES* (*LOB*) und dem Brassinosteroid katabolisierendem Enzym *PHYB ACTIVATION TAGGED SUPPRESSOR1* (*BAS1*) erzeugt (Bell et al., 2012). Der Verlust einer deutlich erkennbaren Begrenzungszone (Abb. 6) und die stark gewundene Sprossachse

(Abb. 5) nach ektoptischer WUS-Induktion sprechen sehr für einen positiven Effekt von WUS auf die Brassinosteroid-Signaltransduktion.

Die Jasmonat-Signaltransduktion ist essentiell für die Pathogenantwort und Verteidigung der Pflanzen gegen Fressfeinde (Acosta und Farmer, 2010). Sie erzeugt eine systemische Antwort bei der schätzungsweise 67 bis 84 Prozent aller bei Fraß induzierten Gene in der gesamten Pflanze aktiviert werden (Reymond et al., 2004). Als gasförmiges Methyljasmonat kann die Signaltransduktion auch in benachbarten Pflanzen induziert werden. Über die Pathogenantwort hinaus, wie Akkumulation von Anthocyanin und vermehrtes Trichomwachstum, spielt Jasmonat ebenfalls eine Rolle in der Staubblattentwicklung (Kazan und Manners, 2012). Die Signaltransduktion ähnelt dabei der von Auxin und Gibberellin. Jasmonat wird durch die Aktivität von JASMONATE RESISTANT1 (JAR1) in die bioaktive Form Jasmonyl-Isoleucin (JA-Ile) umgewandelt und kann so von der CORONATINE INSENSITIVE1 (COI1) Untereinheit, einer E3-Ubiquitinligase, gebunden werden. Der aktive Komplex markiert daraufhin die JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEINE (JAZ) für die Degradierung durch das Proteasom. Dadurch wird ihre repressive Wirkung auf den Transkriptionsfaktor JASMONATE INSENSITIVE1 (JAI1/MYC2) aufgehoben und er kann seine Zielgene aktivieren. Zur primären Jasmonatantwort gehören auch die Gene der Jasmonat-Biosynthese. Die JAZ-Co-Repressoren können über NOVEL INTERACTOR OF JAZ (NINJA) mit TPL/TPR interagieren und ähneln damit stark den AUX/IAA. Zusätzlich können sie mit den DELLA Proteinen interagieren. Der Jasmonat-Signalweg ist also direkt mit Auxin und Gibberellin verbunden (Acosta und Farmer, 2010; Kazan und Manners 2012; Song et al., 2014). Diese Interaktion zeigt sich auch im Wurzelmeristem, wo Jasmonat über MYC2 direkt *PLETHORA* (*PLT*) Gene reprimiert und so zu einer Teilung der Zellen des Ruhenden Zentrums und einer deregulierten Differenzierung der Stammzellen der Wurzelhaube führt (Chen et al., 2011). *PLT* Gene sind einerseits unter der Kontrolle von Auxin, kontrollieren aber ihrerseits die Auxin-Biosynthese und haben somit einen großen Einfluss auf die Phyllotaxis im SAM (Hofhuis et al., 2013; Pinon et al., 2013). Eine weitere Verbindung von Jasmonat mit dem SAM kommt durch die *dab4-1* Mutante. Diese Mutation in *COI1* führt im Ökotyp *Wassilewskija* zu einer deutlich verspäteten Termination des primären SAM (Kim et al., 2013b). Im Kambium unterstützt Jasmonat das sekundäre Dickenwachstum (Sehr et al., 2010). WUS kann, wie bereits bekannt (Busch et al., 2010), verschiedene JAZ-Gene und darüber hinaus *JAR1* und *MYC2* direkt regulieren (Abb.19). Die Effekte von Jasmonat-Behandlung und WUS-Induktion auf das Transkriptom sind, bei aller Ähnlichkeit, deutlich distinkt (Abb. 18). Der Effekt von WUS besteht somit nicht bloß aus der Aktivierung der Jasmonat-Signaltransduktion.

Das neben Cytokinin bedeutendste Pflanzenhormon ist Auxin. Es ist an einer Vielzahl von Wachstums- und Entwicklungsprozessen beteiligt, wie z.B. Zellstreckung, Photo- und Gravitropismus und kontrolliert die Zellteilungsrichtung im Embryo (Enders und Strader, 2015; van Dop et al., 2015). Als eine Art Morphogen definiert es Zelltypen und gibt Entwicklungsschicksale vor oder erhält deren



Identität trotz des Gewebeflusses, wie während der Musterbildung im Embryo, der Definition von Stammzellen und Differenzierungszone in der Wurzel oder der Kontrolle über die Phyllotaxis im SAM (van Dop et al., 2015; Delay et al., 2013; Sassi und Vernoux 2013). Ausschlaggebend ist dabei die räumliche Verteilung des Indol-Derivats innerhalb des Gewebes über spezielle polare Transportmaschinerien mit Proteinen der PIN-FORMED (PIN) Familie (Michniewicz et al., 2007). Mutanten mit fehlregulierter Auxinverteilung sind auf Grund falscher Musterbildung Embryo-letal (Steinmann et al., 1999). Die Auxin-Signaltransduktion während der Entwicklung wurde bereits in der Einleitung eingehend beschreiben. Verkürzt dargestellt führt die Auxin-vermittelte Degradierung von Repressoren der AUX/IAA-Familie zur Freisetzung von ARF-Transkriptionsfaktoren, die die transkriptionelle Antwort vermitteln. Die AUX/IAA-Proteine komplexieren sonst mit den ARFs und TPL/TPR Co-Repressoren und inhibieren die Transkription der Auxin-Zielgene (Szemenyei et al., 2008). Die Bedeutung der gemeinsamen Wirkung von Auxin und Cytokinin ist bereits seit langem bekannt, die Wirkungsweise wird in den meisten Fällen jedoch als antagonistisch angesehen (Skoog und Miller, 1957; Schaller et al., 2015). Eine wichtige Ausnahme ist dabei die Repression von *ARRs* in den Stammzellen des SAM. Diese Repressoren der Cytokinin-Signaltransduktion werden direkt durch WUS reprimiert, um die Stammzellfunktion zu erhalten (Leibfried et al., 2005). Zusätzlich wandert MP/ARF5-Protein von der Peripherie in die Stammzellen und reprimiert die Expression von *ARRs* ebenfalls und unterstützt somit die WUS-Funktion (Zhao et al., 2010).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass WUS die Auxin-Signaltransduktion auf allen Ebenen direkt regulieren kann (Abb. 19). Von allen Hormon-Signaltransduktionswegen ist die direkte Regulierbarkeit durch WUS für Auxin am deutlichsten. Neben dem Rezeptor *TIR1* wird auch ein großer Anteil an *ARFs* und *AUX/IAAs* reguliert. Auf transkriptioneller Ebene weist die WUS-Induktion einen tendenziell gegenteiligen Effekt der Auxin-Behandlung auf (Abb.18). WUS scheint also die Auxin-Signaltransduktion direkt zu reprimieren. Nachdem diese Daten jedoch auf globalen Effekten im gesamten Keimling beruhen, war es notwendig zu überprüfen, ob diese Regulation so auch im SAM stattfinden kann. Lokale Expressionsanalysen in Form von *in situ* Hybridisierungen, durchgeführt von Frau Dr. Anna Medzihradszky, belegen, dass WUS die Expression vom Auxin-Rezeptor *TIR1* und dem Transkriptionsfaktor *MP* auch im Kontext des SAM reprimieren kann (Abb. 20). Auch die Expressionsmuster der übrigen Komponenten der Auxin-Signaltransduktion im SAM unterstützen die Hypothese einer direkten Repression durch WUS. Fast alle *ARFs* und *AUX/IAAs* weisen ein Expressionsmuster komplementär zum Bereich des WUS-Proteins in OC und CZ auf (Vernoux et al., 2011). Diese Muster, mit starker Expression in der Peripherie und schwacher Expression im Bereich der Stammzellen, entsprechen genau der Expression der direkt durch WUS reprimierten *TPR1* und *TPR2* (Busch et al., 2010). Es ist somit gut möglich, dass WUS für diese spezifischen Expressionsmuster im SAM mit verantwortlich ist. Aber gibt es tatsächlich Hinweise auf eine spezifische Repression der Auxin-Signaltransduktion im Bereich der Stammzellen und welche Bedeutung könnte sie haben? Es ist bekannt, dass im Zentrum des SAM eine hohe Konzentration an Auxin durch den spezifischen

Transport in diese Richtung vorliegt, dort jedoch keine transkriptionelle Antwort hervorrufen kann (Vernoux et al., 2011; de Reuille et al., 2006). Ebenso führt das Erscheinen von *WUS*-Expression, während induzierter somatischer Embryogenese, in der Nähe von Zellen mit starker transkriptioneller Antwort auf Auxin zu einer Repression in diesen Zellen und einer Limitierung auf die Spitzen der sich entwickelnden Kotyledonen (Su et al., 2009). Das Muster der Auxin-Antwort entspricht damit dem während der normalen Embryogenese (Wolters et al., 2011). Auch während der embryonalen Musterbildung scheint *WUS* somit die Auxin-Antwort zu reprimieren. Die mögliche Bedeutung dieser Repression im Kontext der Regulation des SAM wird im nachfolgenden Modell zur *WUS*-Funktion eingehender besprochen.

Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass *WUS*, über die direkte Regulation von Transkriptionsfaktoren und Kinasen, eine große Zahl verschiedener biologischer Prozesse gleichzeitig sowohl positiv als auch negativ beeinflussen kann. Dabei stechen die Hormon-Signaltransduktionsprozesse besonders hervor. *WUS* kann an den verschiedenen Prozessschritten gleichzeitig ansetzen, wahrscheinlich um den Signalweg als Ganzes zu regulieren. Von besonderem Interesse ist dabei die Repression der Komponenten der Auxin-Signaltransduktion, die zumindest teilweise so auch im SAM stattfinden kann, und die durch verschiedene bereits publizierte Belege unterstützt wird.

## **V.5 Modell zur Funktion von *WUS* in der Regulation des SAM**

Basierend auf der Diskussion der Ergebnisse ergibt sich folgendes Bild zur Funktion von *WUS* im SAM von *Arabidopsis thaliana*. *WUS* reguliert eine große Anzahl an Genen, die auch durch andere Faktoren reguliert werden können, indem es einen molekularen Komplex mit HDAC-Aktivität nahe zum Transkriptionsstart des jeweiligen Gens rekrutiert. Die Wirkung auf die Expression ist dabei nicht wie ein Schalter, sondern stufenlos und kann durch die HDAC-Aktivität sowohl aktivierend, als auch reprimierend ausfallen. *WUS* wirkt dabei wie ein Verstärker der Expressionsrichtung, die durch andere Faktoren oder Eigenschaften des Locus vorgegeben werden.

Ein großer Teil der direkt durch *WUS* regulierten Zielgene sind Transkriptionsfaktoren, oder Kinasen. *WUS* sitzt damit an der Spitze eines sich schnell verzweigenden Regulationsnetzwerks. Neben Differenzierungsfaktoren sind die *WUS*-Zielgene v.a. Schlüsselkomponenten der Hormon-Signaltransduktion. Durch die gleichzeitige, teilweise gegenläufige, Regulation der einzelnen Komponenten eines Signalweges, kann *WUS* ihn als Ganzes regulieren. *WUS* hat damit eine bedeutende Rolle als Modulator der verschiedenen Hormon-Signale im SAM.

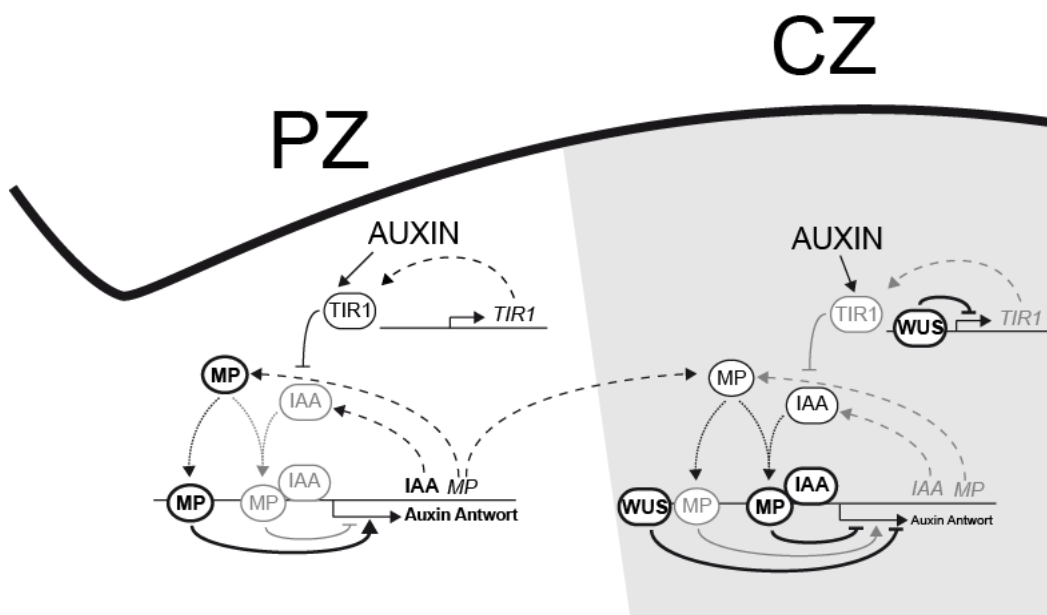
Die Rolle von *WUS* kann man mit der eines Dirigenten vergleichen. Er stimmt die Lautstärke und die Einsätze der einzelnen Musiker eines Orchesters aufeinander ab, indem er sie aktiviert oder inhibiert und ihnen Impulse gibt. In der Symphonie des SAM, dem harmonischen Ablauf aller Prozesse in der Stammzellnische, wären die Musiker mit ihren Instrumenten jeweils die *WUS*-abhängigen Zielgene und die ihnen nachgeordneten Prozesse. Die Musiker sind im Orchester entsprechend ihrer Instrumen-

te in verschiedene Stimmen eingeordnet, so wie die Komponenten der einzelnen Signaltransduktionsprozesse. Während jeder Musiker durch die Partitur prinzipiell weiß, was seine Aufgabe ist, orientiert er sich während der Symphonie aber auch an den anderen Musikern in seiner und den anderen Stimmen. Dies ist vergleichbar mit Rückkopplungsschleifen innerhalb und zwischen verschiedenen Prozessen. Der Dirigent harmonisiert nun die Stimmen indem er die Lautstärke und die Einsätze der einzelnen Musiker desselben Instruments individuell aktiviert oder reprimiert. Die so harmonisierten Stimmen können nun untereinander entsprechend der Gegebenheiten abgestimmt werden. So wird das Ganze durch die Funktion des Dirigenten zu mehr als der Summe verschiedener, paralleler Melodien.

So wie die Streicher im Orchester, ist die Auxin-Signaltransduktion von besonderer Bedeutung für das Wachstum und die Entwicklung der Pflanze. WUS reprimiert die einzelnen Signaltransduktionskomponenten spezifisch im Bereich der Stammzellen und des OC. Ohne eine aktive Repression müsste die hohe Konzentration an Auxin im Bereich der Stammzellen dazu führen, dass das von der Peripherie her eindringende MP seine eigene Expression in den Stammzellen aktiviert, was zu einer ebenso starken Expression wie in der Peripherie führen würde (Zhao et al., 2010; Lau et al., 2011). Die Peripherie ist aber, auf Grund des hohen Levels an ARFs, sehr sensitiv für Auxin und durch das positive Verhältnis an aktivierenden und reprimierenden ARFs stark gegen Fluktuationen gepuffert. Die CZ enthält dagegen sehr wenige ARFs und ist damit, unterstützt durch die geringen Level an TIR1, wenig sensitiv für Auxin (Vernoux et al., 2011). Man darf annehmen, dass diese stark gepufferten Sensitivitätsunterschiede zwischen Peripherie und CZ eine wichtige biologische Funktion haben. WUS verhindert durch die Repression von *TIR1*, das eine höhere Affinität zu AUX/IAAs als die AFBs aufzuweisen scheint (Vernoux et al., 2011), und insbesondere der aktivierenden *ARFs*, dass Auxin in den Stammzellen wahrgenommen und zu einer Aktivierung von Auxin-Zielgenen führen kann, obwohl die Auxin-Level hoch sind. Auch starke Fluktuationen in der Auxinkonzentration können so die Stammzellen nicht beeinflussen. Lediglich die Behandlung des SAM mit einem HDAC-Inhibitor kann, womöglich durch die Suppression des reprimierenden WUS-Effekts, eine Auxin-Antwort in der sonst so resistenten CZ hervorrufen (Smith et al., 2006).

Die reprimierte Sensitivität für Auxin in der CZ mag auch der Grund für die überraschende Kooperation von MP und WUS in der Regulation des SAM sein. Beide gelangen als Protein aus angrenzenden Bereichen in die Stammzellen und reprimieren unabhängig voneinander die Expression von *ARRs*, die die Expression von *CLV3* unterstützen (Daum et al., 2014; Zhao et al., 2010; Leibfried et al., 2005). Nachdem MP normalerweise ein Aktivator ist (Vernoux et al., 2011), überrascht die wichtige Funktion in der CZ als Repressor. Dies könnte daran liegen, dass AUX/IAA-Proteine, auf Grund der geringen Sensitivität der Stammzellen für Auxin, in der CZ weniger degradiert werden und somit mit MP interagieren. AUX/IAAs rekrutieren TPL/TPR Co-Repressoren und reprimieren dadurch aktiv die Expression von Auxin-Zielgenen (Szemenyei et al., 2008). Im Falle der Stammzellen könnte die Repression ein instruktives, Auxin-unabhängiges Signal sein, anstelle der

sonst angenommenen Suppression einer transkriptionellen Antwort in der Auxin-Signaltransduktion. Über das bewegliche MP-Protein würde die Peripherie direkt mit der CZ kommunizieren und sie beeinflussen. Dieselben Komponenten, die auch die Auxin-Antwort vermitteln, würden in den Stammzellen eine davon unabhängige Funktion ausüben. Daher ist es wichtig, dass das Auxin-Signal dort nicht wahrgenommen wird. Voraussetzung für dieses Modell ist jedoch, dass in der CZ genügend AUX/IAAs vorliegen, um einen Repressor-Komplex mit MP zu bilden. Sie könnten z.B. wie MP aus der Peripherie stammen oder in der CZ weniger stark reprimiert werden als *MP*. Abbildung 24 zeigt eine grafische Darstellung des beschriebenen Modells.



**Abb. 24 Regulation der Auxin-Antwort durch WUS in den Stammzellen**

In der Peripheren Zone (PZ) führt die hohe Konzentration an Auxin zur kontinuierlichen, TIR1-vermittelten Degradierung von AUX/IAAs (IAA). Das Verhältnis zwischen transaktivierendem MONOPTEROS (MP) und Repressorkomplex aus MP und IAA liegt stark auf Seiten des Aktivators. Er vermittelt die transkriptionelle Auxin Antwort, die die Transkription von IAAs und, in geringerem Maße von *MP*, beinhaltet. Zusätzlich wandert das Protein in die Zellen der Zentralen Zone (CZ) und aktiviert dort ebenfalls die transkriptionelle Auxin Antwort. Die direkte Repression von *TIR1* durch *WUS* führt in den Stammzellen zu einer Stabilisierung der IAA trotz hoher Auxin-Konzentration. Das Verhältnis zwischen Aktivator und Repressorkomplex liegt hier deutlich auf Seiten des Repressorkomplexes. Zusätzlich zur aktiven Repression der Auxin Antwort durch den MP/IAA Komplex reprimiert *WUS* direkt die Expression der Komponenten der Auxin-Signaltransduktion. Die Menge an Protein im Gleichgewichtszustand ist durch die Linienstärke veranschaulicht. Durchgezogene Pfeile zeigen positive (spitz) oder negative (stumpf) Wirkungen. Gestrichelte Pfeile stehen für Transkriptions- und Translationsprozesse, gepunktete Pfeile für Protein-Bewegung.

## V.6 Perspektiven

Die hier vorgelegte Arbeit liefert nicht nur ein Modell zur globalen molekularen Regulation von *WUS*-Zielgenen, sondern wird durch ihren umfangreichen Datensatz in Zukunft auch Grundlage für viele weitere Fragestellungen sein. Einzelne Fragen blieben bislang jedoch noch offen und müssen aufgeklärt werden.

Nachdem alle globalen Datensätze aus technischen Gründen aus ganzen Keimlingen nach ubiquitärer Induktion des WUS-Effekts gewonnen wurden, sind die Daten nicht spezifisch für das SAM. Aktuell wird daher meristematisches Gewebe nach WUS-Induktion präzise präpariert, um es einer Transkriptomanalyse zuzuführen und die Daten darauf zu filtern.

Zu den interessanten Erkenntnissen dieser Arbeit gehört, dass die Aktivierung der Expression von Zielgenen durch WUS TSA-sensitiv ist. Nachdem nun eine große Anzahl an direkt aktivierten WUS-Zielgenen bekannt ist, wäre es interessant zu untersuchen, ob die gleichen molekularen Komponenten für die Aktivierung wie für die Repression von Zielgenen verantwortlich sind und welche zusätzlichen Faktoren die Richtung der Regulation bestimmen.

Insbesondere die starken Hinweise, dass WUS direkt die Signaltransduktion der verschiedenen Pflanzenhormone direkt regulieren kann, sollte eingehender untersucht und im Kontext des SAM bestätigt werden. Hierzu könnten, neben dem Nachweis der Expression der einzelnen Komponenten durch *in situ* Hybridisierung, auch Hormon-spezifische Reporterlinien, wie *DR5v2*, *R2D2*, *TCS::GFP* und *RGA-GFP* zum Einsatz kommen (Liao et al., 2015; Zürcher et al., 2013; Silverstone et al., 2001). Nachdem erste Versuche mit induzierter Überexpression von WUS gezeigt haben, dass die transkriptionelle Antwort auf Hormone stark gegen äußere Einflüsse gepuffert ist, sollte als nächstes untersucht werden, ob die Regulation durch WUS notwendig ist, um die Expressionsmuster zu erhalten. Hierzu könnte ein etabliertes System zur induzierbaren Abschaltung des WUS-Effekts in den Stammzellen verwendet werden (Daum et al., 2014).

Neben der allgemeinen Überprüfung des Effekts von WUS auf die Wahrnehmung von Hormon-Signalen in den Stammzellen, ist die Untersuchung der WUS-abhängigen Auxin-Signaltransduktion in der CZ von besonderem Interesse. Verschiedene Experimente hierzu befinden sich bereits in der Bearbeitung. Um herauszufinden, ob die geringe Sensitivität für Auxin von Bedeutung für die Stammzellaktivität ist, wird versucht, sie durch ektopische Expression des Rezeptors *TIR1* (*pCLV3::TIR1*) zu erhöhen. Die direkte Repression von *MP* durch WUS wird durch Analysen der Expression von Reportergen nach Deletion der WUS-Binderegion überprüft. Das oben vorgestellte Modell nimmt an, dass *MP* als Repressor in den Stammzellen eine wichtige Funktion für deren Erhalt hat. Es wäre daher interessant, ob die *mp* Mutante Defekte in der Stammzellregulation aufweist. Das Modell setzt auch voraus, dass ausreichend AUX/IAA-Proteine in der CZ vorliegen, um *MP* zu einem Repressor zu machen. Über ihre tatsächlichen Level liegen aber bislang keine Informationen vor. Die Funktion als Repressor könnte einerseits durch die Stammzell-spezifische Expression einer *MP*-Variante, die durch die Deletion der Domänen III und IV zu einem Auxin-unabhängigen Aktivator geworden ist, und einer Variante, an die zusätzlich eine synthetische Repressionsdomäne (SRDX) fusioniert wurde getestet werden (Lau et al., 2011; Ikeda et al., 2009). Nur die zweite Variante sollte in der Lage sein, die unterstützende Funktion auf die Stammzellen auszuüben.

## VI. QUELLENVERZEICHNIS

**Acosta, I. F. und Farmer, E. E.** (2010). Jasmonates. *Arabidopsis Book*, **8**, e0129.

**Adl, S.M., Simpson, A.G., Lane, C.E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., et al.** (2012). The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* **59**: 429–493.

**An, F., Zhao, Q., Ji, Y., Li, W., Jiang, Z., Yu, X., Zhang, C., Han, Y., He, W., Liu, Y., et al.** (2010). Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding F-box 1 and 2 that requires EIN2 in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE*, **22**, 2384–2401.

**Babraham Bioinformatics.** FastQC. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>, Version 0.10.1

**Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W., und Noble, W. S.** (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, **37**, W202–8.

**Barrero, J. M., González-Bayón, R., del Pozo, J. C., Ponce, M. R., und Micol, J. L.** (2007). INCURVATA2 encodes the catalytic subunit of DNA Polymerase alpha and interacts with genes involved in chromatin-mediated cellular memory in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, **19**, 2822–2838.

**Bartrina, I., Otto, E., Strnad, M., Werner, T., und Schmulling, T.** (2011). Cytokinin Regulates the Activity of Reproductive Meristems, Flower Organ Size, Ovule Formation, and Thus Seed Yield in Arabidopsis thaliana. *THE PLANT CELL ONLINE*, **23**, 69–80.

**Bell, E. M., Lin, W.-C., Husbands, A. Y., Yu, L., Jaganatha, V., Jablonska, B., Mangeon, A., Neff, M. M., Girke, T., und Springer, P. S.** (2012). Arabidopsis lateral organ boundaries negatively regulates brassinosteroid accumulation to limit growth in organ boundaries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109**, 21146–21151.

**Belles-Boix, E., Hamant, O., Witiak, S.M., Morin, H., Traas, J., Pautot, V.** (2006). KNAT6: An Arabidopsis Homeobox Gene Involved in Meristem Activity and Organ Separation. *THE PLANT CELL ONLINE*, **18**, 1900–1907.

**Besnard, F., Refahi, Y., Morin, V., Marteaux, B., Brunoud, G., Chambrier, P., Rozier, F., Mirabet, V., Legrand, J., Lainé, S., et al.** (2014). Cytokinin signalling inhibitory fields provide robustness to phyllotaxis. *Nature*, **505**, 417–421.

**Betsuyaku, S., Takahashi, F., Kinoshita, A., Miwa, H., Shinozaki, K., Fukuda, H., Sawa, S.** (2011). Mitogen-activated protein kinase regulated by the CLAVATA receptors contributes to shoot apical meristem homeostasis. *Plant and Cell Physiology* **52**: 14–29.

**Biggin, M. D.** (2011). Animal transcription networks as highly connected, quantitative continua. *Dev. Cell*, **21**, 611–626.

**Birnbaum, K., Shasha, D. E., Wang, J. Y., Jung, J. W., Lambert, G. M., Galbraith, D. W., Benfey, P. N.** (2003). A gene expression map of the Arabidopsis root. *Science*, **302**, 1956–60

**Bleckmann, A., Weidtkamp-Peters, S., Seidel, C. A. M., und Simon, R.** (2009). Stem Cell Signaling in Arabidopsis Requires CRN to Localize CLV2 to the Plasma Membrane. *PLANT PHYSIOLOGY*, **152**, 166–176.

**Bommert, P., Je, B. I., Goldshmidt, A., und Jackson, D.** (2013). The maize Ga gene COMPACT PLANT2 functions in CLAVATA signalling to control shoot meristem size. *Nature*, **502**, 555–558.

**Brand, U., Fletcher, J. C., Hobe, M., und Meyerowitz, E. M.** (2000). Dependence of Stem Cell Fate in Arabidopsis on a Feedback Loop Regulated by CLV3 Activity. *Science*, **289**, 617–619.

**Brand, U., Grünewald, M., Hobe, M., Simon, R.** (2002). Regulation of CLV3 expression by two homeobox genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **129**, 565–575.

**Breuil-Broyer, S., Morel, P., de Almeida-Engler, J., Coustham, V., Negrutiu, I., und Trehin, C.** (2004). High-resolution boundary analysis during Arabidopsis thaliana flower development. *The Plant Journal*, **38**, 182–192.

- Breuninger, H., Rikirsch, E., Hermann, M., Ueda, M., und Laux, T.** (2008). Differential Expression of WOX Genes Mediates Apical-Basal Axis Formation in the Arabidopsis Embryo. *Dev. Cell*, **14**, 867–876.
- Busch, W., Miotk, A., Ariel, F. D., Zhao, Z., Forner, J., Daum, G., Suzaki, T., Schuster, C., Schultheiss, S. J., Leibfried, A., et al.** (2010). Transcriptional control of a plant stem cell niche. *Dev. Cell*, **18**, 849–861.
- Byrne, M. E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J. M., Dunham, M., Hudson, A., und Martienssen, R. A.** (2000). Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. *Nature*, **408**, 967–971.
- Byrne, M. E., Simorowski, J., und Martienssen, R. A.** (2002). ASYMMETRIC LEAVES1 reveals knox gene redundancy in Arabidopsis. *Development*, **129**, 1957–1965.
- Caesar, K., Thamm, A. M. K., Witthöft, J., Elgass, K., Huppenberger, P., Grefen, C., Horák, J., und Harter, K.** (2011). Evidence for the localization of the Arabidopsis cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 5571–5580.
- Campbell, N. A. und Reece, J. B.** (2010). Campbell Biologie (Pearson Deutschland GmbH).
- Causier, B., Ashworth, M., Guo, W., und Davies, B.** (2012). The TOPLESS Interactome: A Framework for Gene Repression in Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY*, **158**, 423–438.
- Chang, S. und Pikaard, C. S.** (2005). Transcript profiling in Arabidopsis reveals complex responses to global inhibition of DNA methylation and histone deacetylation. *J. Biol. Chem.*, **280**, 796–804.
- Chapman, E. J. und Estelle, M.** (2009). Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Genet.*, **43**, 265–285.
- Chen, Q., Sun, J., Zhai, Q., Zhou, W., Qi, L., Xu, L., Wang, B., Chen, R., Jiang, H., Qi, J., et al.** (2011). The basic helix-loop-helix transcription factor MYC2 directly represses PLETHORA expression during jasmonate-mediated modulation of the root stem cell niche in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE*, **23**, 3335–3352.
- Chickarmane, V. S., Gordon, S. P., Tarr, P. T., Heisler, M. G., und Meyerowitz, E. M.** (2012). Cytokinin signaling as a positional cue for patterning the apical-basal axis of the growing Arabidopsis shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 4002–4007.
- Clark, S. E., Williams, R. W., und Meyerowitz, E. M.** (1997). The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. *Cell*, **89**, 575–585.
- Clough, S. J. und Bent, A. F.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.*, **16**, 735–743.
- Clouse, S. D.** (2011). Brassinosteroids. *Arabidopsis Book*, **9**, e0151.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K., und Scheible, W.-R.** (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY*, **139**, 5–17.
- D'Agostino I., Deruère J., Kieber J.J.** (2000) Characterization of the response of the Arabidopsis *ARR* gene family to cytokinin. *Plant Physiol.*, **124**, 1706–1717.
- Daum, G.** (2014). A Mechanistic Framework for Non-Cell Autonomous Stem Cell Induction by WUSCHEL in the Arabidopsis thaliana Shoot Apical Meristem, *Dissertation*
- Daum, G., Medzihradsky, A., Suzaki, T., und Lohmann, J. U.** (2014). A mechanistic framework for noncell autonomous stem cell induction in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **111**, 14619–14624.
- Davière, J.-M. und Achard, P.** (2013). Gibberellin signaling in plants. *Development*, **140**, 1147–1151.
- Davière, J.-M., Wild, M., Regnault, T., Baumberger, N., Eisler, H., Genschik, P., und Achard, P.** (2014). Class I TCP-DELLA interactions in inflorescence shoot apex determine plant height. *Curr. Biol.*, **24**, 1923–1928.

- de Reuille, P., Bohn-Courseau, I., Ljung, K., Morin, H., Carraro, N., Godin, C., und Traas, J.** (2006). Computer simulations reveal properties of the cell-cell signaling network at the shoot apex in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 1627–1632.
- Deal, R. B. und Henikoff, S.** (2011). The INTACT method for cell type-specific gene expression and chromatin profiling in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Protoc*, **6**, 56–68.
- Delay, C., Imin, N., und Djordjevic, M. A.** (2013). Regulation of *Arabidopsis* root development by small signaling peptides. *Front Plant Sci*, **4**, 352.
- Deyhle, F., Sarkar, A. K., Tucker, E. J., und Laux, T.** (2007). WUSCHEL regulates cell differentiation during anther development. *Developmental Biology*, **302**, 154–159.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., und Estelle, M.** (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, **435**, 441–445.
- Dortay, H., Mehnert, N., Bürkle, L., Schmülling, T., und Heyl, A.** (2006). Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J.*, **273**, 4631–4644.
- Elliott, R. C., Betzner, A. S., Huttner, E., Oakes, M. P., Tucker, W. Q., Gerentes, D., Perez, P., und Smyth, D. R.** (1996). AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell*, **8**, 155–168.
- Enders, T. A. und Strader, L. C.** (2015). Auxin activity: Past, present, and future. *Am. J. Bot.*, **102**, 180–196.
- Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J. Z., und Laux, T.** (1996). The SHOOT MERISTEMLESS gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes WUSCHEL and ZWILLE. *Plant J.*, **10**, 967–979.
- Etchells, J. P., Provost, C. M., und Turner, S. R.** (2012). Plant vascular cell division is maintained by an interaction between PXY and ethylene signalling. *PLoS Genet*, **8**, e1002997.
- Etchells, J. P., Provost, C. M., Mishra, L., und Turner, S. R.** (2013). WOX4 and WOX14 act downstream of the PXY receptor kinase to regulate plant vascular proliferation independently of any role in vascular organisation. *Development*, **140**, 2224–2234.
- Fan, X., Lamarre-Vincent, N., Wang, Q., und Struhl, K.** (2008). Extensive chromatin fragmentation improves enrichment of protein binding sites in chromatin immunoprecipitation experiments. *Nucleic Acids Research*, **36**, e125–e125.
- Fell, D. A.** (1997). Understanding the Control of Metabolism. *Portland Press*, London
- Field, C., Behrenfeld, M., Randerson, J., und Falkowski, P.** (1998). Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, **281**, 237–240.
- Fletcher, J. C., Brand, U., Running, M. P., Simon, R., und Meyerowitz, E. M.** (1999). Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science*, **283**, 1911–1914.
- Fraley, R.T., Horsch, R.B., Rogers, S.G., Eichholtz, D.A., Flick, J.S., Fink, C.L., Hoffmann, N.L., und Sanders, P.A.** (1985). The SEV System: A new disarmed Ti plasmid vector system for plant transformation. *Nat Biotechnol*, **3**, 629–635
- Fulton, L., Batoux, M., Vaddepalli, P., Yadav, R. K., Busch, W., Andersen, S. U., Jeong, S., Lohmann, J. U., und Schneitz, K.** (2009). DETORQUEO, QUIRKY, and ZERZAUST represent novel components involved in organ development mediated by the receptor-like kinase STRUBBELIG in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*, **5**, e1000355.
- Gaillochet, C. und Lohmann, J. U.** (2015). The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity. *Development*, **142**, 2237–2249.



- Gaillochet, C., Daum, G., and Lohmann, J. U.** (2015). O cell, where art thou? The mechanisms of shoot meristem patterning. *Current Opinion in Plant Biology*, **23**, 91–97.
- Galbraith, D. W., Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. M., Sharma, D. P., and Firoozabady, E.** (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, **220**, 1049–1051.
- Gallois, J., Nora, F., Mizukami, Y., and Sablowski, R.** (2004). WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. *Genes & Development*, **18**, 375–380.
- Gallois, J.-L., Woodward, C., Reddy, G. V., and Sablowski, R.** (2002). Combined SHOOT MERISTEMLESS and WUSCHEL trigger ectopic organogenesis in Arabidopsis. *Development*, **129**, 3207–3217.
- Gao, M.-J., Parkin, I., Lydiate, D., and Hannoufa, A.** (2004). An auxin-responsive SCARECROW-like transcriptional activator interacts with histone deacetylase. *Plant Mol Biol*, **55**, 417–431.
- Gendrel, A.-V., Lippman, Z., Martienssen, R., and Colot, V.** (2005). Profiling histone modification patterns in plants using genomic tiling microarrays. *Nat Meth*, **2**, 213–218.
- Gendron, J. M., Liu, J.-S., Fan, M., Bai, M.-Y., Wenkel, S., Springer, P. S., Barton, M. K., and Wang, Z.-Y.** (2012). Brassinosteroids regulate organ boundary formation in the shoot apical meristem of Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109**, 21152–21157.
- Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., et al.** (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*, **5**, R80.
- Glass, G. V.** (1976). Primary, Secondary, and Meta-Analysis of Research. *Educational Researcher*, **5**, 3–8.
- Goda, H., Sasaki, E., Akiyama, K., Maruyama-Nakashita, A., Nakabayashi, K., Li, W., Ogawa, M., Yamauchi, Y., Preston, J., Aoki, K., et al.** (2008). The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *Plant Journal*, **55**(3), 526–42.
- Gordon, S. P., Chickarmane, V. S., Ohno, C., and Meyerowitz, E. M.** (2009). Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the Arabidopsis shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 16529–16534.
- Guilfoyle, T. J. and Hagen, G.** (2007). Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**, 453–460.
- Guo, M., Thomas, J., Collins, G., and Timmermans, M. C. P.** (2008). Direct Repression of KNOX Loci by the ASYMMETRIC LEAVES1 Complex of Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE*, **20**, 48–58.
- Ha, M., Ng, D.W., Li, W.H., Chen, Z.J.** (2011). Coordinated histone modifications are associated with gene expression variation within and between species. *Genome Research*, **21**(4):590-598
- Haecker, A., Gross-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M., Laux, T.** (2004). Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in Arabidopsis thaliana. *Development*, **131**, 657–668.
- Hamann, T., Benková, E., Bäurle, I., Kientz, M., and Jürgens, G.** (2002). The Arabidopsis BODENLOS gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes & Development*, **16**, 1610–1615.
- Han, P., Li, Q., and Zhu, Y. X.** (2008). Mutation of Arabidopsis BARD1 Causes Meristem Defects by Failing to Confine WUSCHEL Expression to the Organizing Center. *THE PLANT CELL ONLINE*, **20**, 1482–1493.
- Hay, A., Kaur, H., Phillips, A., Hedden, P., Hake, S., and Tsiantis, M.** (2002). The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans. *Current Biology*, **12**, 1557–1565.
- Hecker, A., Brand, L. H., Peter, S., Simoncello, N., Kilian, J., Harter, K., Gaudin, V., and Wanke, D.** (2015). The Arabidopsis GAGA-Binding Factor BASIC PENTACYSTEINE6 Recruits the POLYCOMB-REPRESSIVE

COMPLEX1 Component LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1 to GAGA DNA Motifs. *PLANT PHYSIOLOGY*, **168**, 1013–1024.

**Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y. C., Laslo, P., Cheng, J. X., Murre, C., Singh, H., and Glass, C. K.** (2010). Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Molecular Cell*, **38**, 576–589.

**Heisler, M. G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G. V., Long, J. A., and Meyerowitz, E. M.** (2005). Patterns of Auxin Transport and Gene Expression during Primordium Development Revealed by Live Imaging of the Arabidopsis Inflorescence Meristem. *Current Biology*, **15**, 1899–1911.

**Heldman, D.R.** (2003). Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering (Print) (CRC Press).

**Heyndrickx, K.S., Van de Velde, J., Wang, C., Weigel, D., Vandepoele, K.** (2014). A functional and evolutionary perspective on transcription factor binding in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, **26**(10), 3894–3910.

**Hofhuis, H., Laskowski, M., Du, Y., Prasad, K., Grigg, S., Pinon, V., and Scheres, B.** (2013). Phyllotaxis and rhizotaxis in Arabidopsis are modified by three PLETHORA transcription factors. *Curr. Biol.*, **23**, 956–962.

**Hollender, C. und Liu, Z.** (2008). Histone deacetylase genes in Arabidopsis development. *Journal of Integrative Plant Biology*, **50**, 875–885.

**Ikeda, M., Mitsuda, N., und Ohme-Takagi, M.** (2009). Arabidopsis WUSCHEL Is a Bifunctional Transcription Factor That Acts as a Repressor in Stem Cell Regulation and as an Activator in Floral Patterning. *THE PLANT CELL ONLINE*, **21**, 3493–3505.

**Illumina.** iGenome Packet Arabidopsis thaliana.

[ftp://igenome:G3nom3s4u@ussd-ftp.illumina.com/Arabidopsis\\_thaliana/NCBI/TAIR10/Arabidopsis\\_thaliana\\_NCBI\\_TAIR10.tar.gz](ftp://igenome:G3nom3s4u@ussd-ftp.illumina.com/Arabidopsis_thaliana/NCBI/TAIR10/Arabidopsis_thaliana_NCBI_TAIR10.tar.gz)

**Inoue, H., Nojima, H., und Okayama, H.** (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, **96**, 23–28.

**Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., und Kakimoto, T.** (2001). Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. *Nature*, **409**, 1060–1063.

**Ishida, T., Tabata, R., Yamada, M., und Aida, M.** (2014). Heterotrimeric G proteins control stem cell proliferation through CLAVATA signaling in Arabidopsis. *EMBO Reports*, **11**, 1202–1209

**Jasinski, S., Piazza, P., Craft, J., Hay, A., Woolley, L., Rieu, I., Phillips, A., Hedden, P., und Tsiantis, M.** (2005). KNOX Action in Arabidopsis Is Mediated by Coordinate Regulation of Cytokinin and Gibberellin Activities. *Current Biology*, **15**, 1560–1565.

**Ji, J., Strable, J., Shimizu, R., Koenig, D., Sinha, N., und Scanlon, M. J.** (2010). WOX4 Promotes Procambial Development. *PLANT PHYSIOLOGY*, **152**, 1346–1356.

**Jönsson, H., Heisler, M., Shapiro, B., MEYEROWITZ, E., und Mjolsness, E.** (2006). An auxin-driven polarized transport model for phyllotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 1633–1638.

**Jouannet, V., Brackmann, K., und Greb, T.** (2015). (Pro)cambium formation and proliferation: two sides of the same coin? *Current Opinion in Plant Biology*, **23**, 54–60.

**Kakimoto, T.** (2001). Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology*, **42**, 677–685.

**Kaya, H., Shibahara, K. I., Taoka, K. I., Iwabuchi, M., Stillman, B., und Araki, T.** (2001). FASCIATA genes for chromatin assembly factor-1 in arabidopsis maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell*, **104**, 131–142.

**Kazan, K. und Manners, J. M.** (2012). JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends in Plant Science*, **17**, 22–31.

- Kiba, T., Yamada, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Yamashino, T., und Mizuno, T.** (2003). The type-A response regulator, ARR15, acts as a negative regulator in the cytokinin-mediated signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **44**, 868–874.
- Kieber, J. J. und Schaller, G. E.** (2014). Cytokinins. *Arabidopsis Book*, **12**, e0168.
- Kieffer, M., Stern, Y., Cook, H., Clerici, E., Maulbetsch, C., Laux, T., Davies, B.** (2006). Analysis of the Transcription Factor WUSCHEL and Its Functional Homologue in Antirrhinum Reveals a Potential Mechanism for Their Roles in Meristem Maintenance. *THE PLANT CELL ONLINE*, **18**, 560–573.
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., und Salzberg, S. L.** (2013a). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol*, **14**, R36.
- Kim, J., Dotson, B., Rey, C., Lindsey, J., Bleecker, A. B., Binder, B. M., und Patterson, S. E.** (2013b). New clothes for the jasmonic acid receptor COI1: delayed abscission, meristem arrest and apical dominance. *PLoS ONE*, **8**, e60505.
- Kinoshita, A., Betsuyaku, S., Osakabe, Y., Mizuno, S., Nagawa, S., Stahl, Y., Simon, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Fukuda, H., und Sawa, S.** (2010). RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in *Arabidopsis*. *Development*, **137**, 3911–3920.
- Knauer, S., Holt, A. L., Rubio-Somoza, I., Tucker, E. J., Hinze, A., Pisch, M., Javelle, M., Timmermans, M. C., Tucker, M. R., und Laux, T.** (2013). A protodermal miR394 signal defines a region of stem cell competence in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Dev. Cell*, **24**, 125–132.
- Koch, G. W., Sillett, S. C., Jennings, G. M., und Davis, S. D.** (2004). The limits to tree height. *Nature*, **428**, 851–854.
- Kosugi, S., und Ohashi, Y.** (2002). DNA binding and dimerization specificity and potential targets for the TCP protein family. *Plant Journal*, **3**, 337–348.
- Krogan, N. T., Hogan, K., und Long, J. A.** (2012). APETALA2 negatively regulates multiple floral organ identity genes in *Arabidopsis* by recruiting the co-repressor TOPLESS and the histone deacetylase HDA19. *Development*, **139**, 4180–4190.
- Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H., und Kyoizuka, J.** (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, **445**, 652–655.
- Kuroha, T., Tokunaga, H., Kojima, M., Ueda, N., Ishida, T., Nagawa, S., Fukuda, H., Sugimoto, K., und Sakakibara, H.** (2009). Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *THE PLANT CELL ONLINE*, **21**, 3152–3169.
- Kwon, C., Chen, C., und Wagner, D.** (2005). WUSCHEL is a primary target for transcriptional regulation by SPLAYED in dynamic control of stem cell fate in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, **19**, 992–1003.
- Langmead, B. und Salzberg, S. L.** (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Meth*, **9**, 357–359.
- Lau, S., De Smet, I., Kolb, M., Meinhardt, H., und Jürgens, G.** (2011). Auxin triggers a genetic switch. *Nat Cell Biol*, **13**, 611–615.
- Laux, T.** (2003). The stem cell concept in plants: a matter of debate. *Cell*.
- Laux, T., Mayer, K. F., Berger, J., und Jurgens, G.** (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*, **122**, 87–96.
- Lee, D. J., Park, J.-Y., Ku, S.-J., Ha, Y.-M., Kim, S., Kim, M. D., Oh, M.-H., und Kim, J.** (2007). Genome-wide expression profiling of ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 7(ARR7) overexpression in cytokinin response. *Mol. Genet. Genomics*, **277**, 115–137.

- Leibfried, A., To, J. P. C., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J. J., und Lohmann, J. U.** (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature*, **438**, 1172–1175.
- Lenhard, M., Bohnert, A., Jurgens, G., und Laux, T.** (2001). Termination of stem cell maintenance in Arabidopsis floral meristems by interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. *Cell*, **105**, 805–814.
- Lenhard, M., Jürgens, G., und Laux, T.** (2002). The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in Arabidopsis shoot meristem regulation. *Development*, **129**, 3195–3206.
- Leplat, C., Champeimont, R., Saenkham, P., Cassier-Chauvat, C., Jean-Christophe, A., Chauvat, F.,** (2013) Genome-wide transcriptome analysis of hydrogen production in the cyanobacterium Synechocystis: Towards the identification of new players, *International Journal of Hydrogen Energy*, **4**, 1866-1872
- Levesque, M. P., Vernoux, T., Busch, W., Cui, H., Wang, J. Y., Blilou, I., Hassan, H., Nakajima, K., Matsumoto, N., Lohmann, J. U., et al.** (2006). Whole-genome analysis of the SHORT-ROOT developmental pathway in Arabidopsis. *Plos Biol*, **4**, e143.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 1000 Genome Project Data Processing Subgroup** (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, **25**, 2078–2079.
- Liao, C.-Y., Smet, W., Brunoud, G., Yoshida, S., Vernoux, T., und Weijers, D.** (2015). Reporters for sensitive and quantitative measurement of auxin response. *Nat Meth*, **12**, 207–10– 2 p following 210.
- Ligges, U. und Mächler, M.** (2003). Scatterplot3d - an R Package for Visualizing Multivariate Data. *Journal of Statistical Software* 8(11), 1-20.
- Lin, H., Niu, L., McHale, N. A., Ohme-Takagi, M., Mysore, K. S., und Tadege, M.** (2013). Evolutionarily conserved repressive activity of WOX proteins mediates leaf blade outgrowth and floral organ development in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110**, 366–371.
- Liu, J., Sheng, L., Xu, Y., Li, J., Yang, Z., Huang, H., und Xu, L.** (2014a). WOX11 and 12 are involved in the first-step cell fate transition during de novo root organogenesis in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE*, **26**, 1081–1093.
- Liu, X., Gao, L., Dinh, T. T., Shi, T., Li, D., Wang, R., Guo, L., Xiao, L., und Chen, X.** (2014b). DNA topoisomerase I affects polycomb group protein-mediated epigenetic regulation and plant development by altering nucleosome distribution in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE*, **26**, 2803–2817.
- Livak, K. J. und Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402–408.
- Lodha, M., Marco, C. F., und Timmermans, M. C. P.** (2009). Genetic and Epigenetic Regulation of Stem Cell Homeostasis in Plants. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **73**, 243–251.
- Loftas, T. und Ross, J** (1995). Dimensions of need : an atlas of food and agriculture (Rome, Italy : Food and Agriculture Organization of the United Nations).
- Lohmann, J. U., Hong, R. L., Hobe, M., Busch, M. A., Parcy, F., Simon, R., und Weigel, D.** (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in Arabidopsis. *Cell*, **105**, 793–803.
- Long, J. A., Moan, E. I., Medford, J. I., und Barton, M. K.** (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of Arabidopsis. *Nature*, **379**, 66–69.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., und Chua, N. H.** (2001). A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, 4782–4787.

- Lüttge, U. und Kluge, M.** (2012). Botanik John Wiley & Sons.
- Lyons, T. W., Reinhard, C. T., und Planavsky, N. J.** (2014). The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. *Nature*, **506**, 307–315.
- Maere, S., Heymans, K., und Kuiper, M.** (2005). BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*, **21**, 3448–3449.
- Mardis, E. R.** (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genom. Human Genet.*, **9**, 387–402.
- Margueron, R. und Reinberg, D.** (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, **469**, 343–349.
- Mayer, K. F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G., und Laux, T.** (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell*, **95**, 805–815.
- Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., Koornneef, M.** (1998). Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis. *Nature*, **282**, 679–682.
- Meguro, A. und Sato, Y.** (2014). Salicylic acid antagonizes abscisic acid inhibition of shoot growth and cell cycle progression in rice. *Sci Rep*, **4**, 4555.
- Mendoza-Parra, M.-A., van Gool, W., Trindade, L. M., Shankaranarayanan, P., und Gronemeyer, H.** (2012). Single-tube linear DNA amplification for genome-wide studies using a few thousand cells. *Nat Protoc*, **7**, 328–338.
- Merelo, P., Xie, Y., Brand, L., Ott, F., Weigel, D., Bowman, J. L., Heisler, M. G., und Wenkel, S.** (2013). Genome-wide identification of KANADI1 target genes. *PLoS ONE*, **8**, e77341.
- Michniewicz, M., Brewer, P. B., und Friml, J. Í.** (2007). Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. *Arabidopsis Book*, **5**, e0108.
- Mitton, J. B. und Grant, M. C.** (1996). Genetic variation and the natural history of quaking aspen. *Bioscience*.
- Moyroud, E., Minguet, E. G., Ott, F., Yant, L., Posé, D., Monniaux, M., Blanchet, S., Bastien, O., Thévenon, E., Weigel, D., Schmid, M., Parcy, F.** (2011). Prediction of regulatory interactions from genome sequences using a biophysical model for the Arabidopsis LEAFY transcription factor. *Plant Cell*, **23**(4), 1293–1306.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.*, **155**, 335–350.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., und Erlich, H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **51 Pt 1**, 263–273.
- Munné-Bosch, S.** (2014). Perennial roots to immortality. *PLANT PHYSIOLOGY*, **166**, 720–725.
- Murashige, T., und Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, **15**(3): 473–497
- Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y.-C., Park, S.-H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Katoh, E., Iuchi, S., Kobayashi, M., et al.** (2006). Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. *Plant J.*, **46**, 880–889.
- Nakata, M., Matsumoto, N., Tsugeki, R., Rikirsch, E., Laux, T., und Okada, K.** (2012). Roles of the middle domain-specific WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN genes in early development of leaves in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE*, **24**, 519–535.
- Neuwirth, E.** (2007) RColorBrewer: ColorBrewer palettes. R package version 1.0-2

- Ng, L. M., Melcher, K., Teh, B. T., und Xu, H. E.** (2014). Absciscic acid perception and signaling: structural mechanisms and applications. *Acta Pharmacol. Sin.*, **35**, 567–584.
- Nole-Wilson, S. und Krizek, B. A.** (2000). DNA binding properties of the Arabidopsis floral development protein AINTEGUMENTA. *Nucleic Acids Research*, **28**, 4076–4082.
- Ogata, H., Goto, S., Fujibuchi, W., und Kanehisa, M.** (1998). Computation with the KEGG pathway database. *BioSystems*, **47**, 119–128.
- Ogawa, M., Shinohara, H., Sakagami, Y., und Matsubayashi, Y.** (2008). Arabidopsis CLV3 Peptide Directly Binds CLV1 Ectodomain. *Science*, **319**, 294–294.
- Park, S. O., Zheng, Z., Oppenheimer, D.G., Hauser, B.A.** (2005). The PRETTY FEW SEEDS2 gene encodes an Arabidopsis homeodomain protein that regulates ovule development. *Development*, **132**, 841–849.
- Petrásek, J. und Friml, J.** (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development*, **136**, 2675–2688.
- Pi, L., Aichinger, E., van der Graaff, E., Llavata-Peris, C. I., Weijers, D., Hennig, L., Groot, E., und Laux, T.** (2015). Organizer-Derived WOX5 Signal Maintains Root Columella Stem Cells through Chromatin-Mediated Repression of CDF4 Expression. *Dev. Cell*, **33**, 576–588.
- Pinon, V., Prasad, K., Grigg, S. P., Sanchez-Perez, G. F., und Scheres, B.** (2013). Local auxin biosynthesis regulation by PLETHORA transcription factors controls phyllotaxis in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110**, 1107–1112.
- Quinlan, A. R.** (2014). BEDTools: The Swiss-Army Tool for Genome Feature Analysis. *Curr Protoc Bioinformatics*, **47**, 11.12.1–11.12.34.
- Razem, F. A., Baron, K., und Hill, R. D.** (2006). Turning on gibberellin and absciscic acid signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, **9**, 454–459.
- Reddy, G. V., Heisler, M.G., Ehrhardt, D.W., Meyerowitz, E.M.** (2004). Real-time lineage analysis reveals oriented cell divisions associated with morphogenesis at the shoot apex of Arabidopsis thaliana. *Development*, **131**, 4225–4237.
- Reddy, G.V. and Meyerowitz, E.M.** (2005). Stem-Cell Homeostasis and Growth Dynamics Can Be Uncoupled in the Arabidopsis Shoot Apex. *Science* **310**: 663–667.
- Reinhardt, D., Frenz, M., Mandel, T., Kuhlmeier, C.** (2003). Microsurgical and laser ablation analysis of interactions between the zones and layers of the tomato shoot apical meristem. *Development*, **130**, 4073–4083.
- Reinhardt, D., Mandel, T., Kuhlmeier, C.** (2000). Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* **12**: 507–518.
- Reinhart, B. J., Liu, T., Newell, N.R., Magnani, E., Huang, T., Kerstetter, R., Michaels, S., Barton, M. K.** (2013). Establishing a framework for the Ad/abaxial regulatory network of Arabidopsis: ascertaining targets of class III homeodomain leucine zipper and KANADI regulation. *Plant Cell*, **25**(9), 3228–3249.
- Reymond, P., Bodenhausen, N., Van Poecke, R. M. P., Krishnamurthy, V., Dicke, M., und Farmer, E. E.** (2004). A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *Plant Cell*, **16**, 3132–3147.
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacqumard, A., und Murray, J. A.** (1999). Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science*, **283**, 1541–1544.
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., und Smyth, G. K.** (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, **43**, e47.

- Rojo, E., Sharma, V. K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., und Fletcher, J. C.** (2002). CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the Arabidopsis CLAVATA stem cell signaling pathway. *Plant Cell*, **14**, 969–977.
- Romera-Branchat, M., Ripoll, J. J., Yanofsky, M. F., und Pelaz, S.** (2013). The WOX13 homeobox gene promotes replum formation in the Arabidopsis thaliana fruit. *Plant J.*, **73**, 37–49.
- Roslan, H. A., Salter, M. G., Wood, C. D., White, M. R., Croft, K. P., Robson, F., Coupland, G., Doonan, J., Laufs, P., Tomsett, A. B., et al.** (2001). Characterization of the ethanol-inducible alc gene-expression system in Arabidopsis thaliana. *Plant J.*, **28**, 225–235.
- Rothwell, G. W., Scheckler, S. E., und Gillespie W. H.** (1989). Elkinsia gen. nov., a Late Devonian Gymnosperm with Cupulate Ovules. *Botanical Gazette*, **150**, 170-189.
- Ruonala, R., Rinne, P. L. H., Baghour, M., Moritz, T., Tuominen, H., und Kangasjärvi, J.** (2006). Transitions in the functioning of the shoot apical meristem in birch (Betula pendula) involve ethylene. *Plant J.*, **46**, 628–640.
- Russell, J. und Cohn, R.** (2012). Iucn Red List Endangered Species (Book on Demand Limited).
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., und Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487–491.
- Sambrook, J. und Russell, D. W.** (2001). Molecular Cloning CSHL Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **74**, 5463–5467.
- Sarkar, A. K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra, R., und Laux, T.** (2007). Conserved factors regulate signalling in Arabidopsis thaliana shoot and root stem cell organizers. *Nature*, **446**, 811–814.
- Sassi, M. und Vernoux, T.** (2013). Auxin and self-organization at the shoot apical meristem. *Journal of Experimental Botany*, **64**, 2579–2592.
- Satina, S., Blakeslee, A., und Avery, A. G.** (1940). Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of Datura by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. *Am. J. Bot.*, 895–905.
- Schaller, G. E., Bishopp, A., und Kieber, J. J.** (2015). The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. *THE PLANT CELL ONLINE*, **27**, 44–63.
- Schaller, G.E. , Kieber J.J., Shiu S.-H.** (2008). Two-component signaling elements and histidyl-aspartyl phosphorelays. *Arabidopsis Book* **6**: e0112.
- Schaller, G. E., Shiu, S.-H., und Armitage, J. P.** (2011). Two-component systems and their co-option for eukaryotic signal transduction. *Curr. Biol.*, **21**, R320–30.
- Scherrer, L. C., Picard, D., Massa, E., Harmon, J. M., Simons, S. S., Yamamoto, K. R., und Pratt, W. B.** (1993). Evidence that the hormone binding domain of steroid receptors confers hormonal control on chimeric proteins by determining their hormone-regulated binding to heat-shock protein 90. *Biochemistry*, **32**, 5381–5386.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al.** (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Meth*, **9**, 676–682.
- Schmitt, H.** (1972). Blue Marble: AS17-148-22727
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., und Mayer, K.** (2000). The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell*.

- Schubert, D., Clarenz, O., und Goodrich, J.** (2005). Epigenetic control of plant development by Polycomb-group proteins. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 553–561.
- Schuster, C., Gaillochet, C., Medzihradsky, A., Busch, W., Daum, G., Krebs, M., Kehle, A., und Lohmann, J. U.** (2014). A regulatory framework for shoot stem cell control integrating metabolic, transcriptional, and phytohormone signals. *Dev. Cell*, **28**, 438–449.
- Sehr, E. M., Agusti, J., Lehner, R., Farmer, E. E., Schwarz, M., und Greb, T.** (2010). Analysis of secondary growth in the Arabidopsis shoot reveals a positive role of jasmonate signalling in cambium formation. *Plant J.*, **63**, 811–822.
- Shakeel, S. N., Wang, X., Binder, B. M., und Schaller, G. E.** (2013). Mechanisms of signal transduction by ethylene: overlapping and non-overlapping signalling roles in a receptor family. *AoB Plants*, **5**, plt010.
- Shankaranarayanan, P., Mendoza-Parra, M. A., van Gool, W., Trindade, L. M., Gronemeyer, H.** (2012). Single-tube linear DNA amplification for genome-wide studies using a few thousand cells. *Nat. Protoc.*, **7**(2), 328–338.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., und Ideker, T.** (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, **13**, 2498–2504.
- Silverstone, A. L., Jung, H. S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y., und Sun, T. P.** (2001). Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. *Plant Cell*, **13**, 1555–1566.
- Simonini, S. und Kater, M. M.** (2014). Class I BASIC PENTACYSTEINE factors regulate HOMEODOMAIN genes involved in meristem size maintenance. *Journal of Experimental Botany*, **65**, 1455–1465.
- Simonini, S., Roig-Villanova, I., Gregis, V., Colombo, B., Colombo, L., und Kater, M. M.** (2012). Basic pentacysteine proteins mediate MADS domain complex binding to the DNA for tissue-specific expression of target genes in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE*, **24**, 4163–4172.
- Sitte, P.** (2002). Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. (Spektrum Akademischer Verlag; Auflage: 35. Aufl.)
- Skoog, F. und Miller, C. O.** (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **11**, 118–130.
- Skylar, A., Hong, F., Chory, J., Weigel, D., und Wu, X.** (2010). STIMPY mediates cytokinin signaling during shoot meristem establishment in Arabidopsis seedlings. *Development*, **137**, 541–549.
- Smith, C. L.** (2008). A shifting paradigm: histone deacetylases and transcriptional activation. *BioEssays*, **30**, 15–24.
- Smith, R. S., Guyomarc'h, S., Mandel, T., Reinhardt, D., Kuhlemeier, C., und Prusinkiewicz, P.** (2006). A plausible model of phyllotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 1301–1306.
- Song, S., Qi, T., Wasternack, C., und Xie, D.** (2014). Jasmonate signaling and crosstalk with gibberellin and ethylene. *Current Opinion in Plant Biology*, **21**, 112–119.
- Steeves, T.A. und Sussex, I.M.** (1989). Patterns in Plant Development (Cambridge University Press).
- Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C. L., Paris, S., Gälweiler, L., Palme, K., und Jurgens, G.** (1999). Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science*, **286**, 316–318.
- Stewart, R. und Dermen, H.** (1970). Determination of number and mitotic activity of shoot apical initial cells by analysis of mericlinal chimeras. *Am. J. Bot.*, 816–826.
- Su, Y. H., Zhao, X. Y., Liu, Y. B., Zhang, C. L., O'Neill, S. D., und Zhang, X. S.** (2009). Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **59**, 448–460.



- Suer, S., Agusti, J., Sanchez, P., Schwarz, M., und Greb, T.** (2011). WOX4 imparts auxin responsiveness to cambium cells in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE*, **23**, 3247–3259.
- Sugimoto, K., Gordon, S. P., und Meyerowitz, E. M.** (2011). Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends in Cell Biology*, 1–7.
- Sun, T.-P.** (2008). Gibberellin metabolism, perception and signaling pathways in Arabidopsis. *Arabidopsis Book*, **6**, e0103.
- Suzuki, T., Miwa, K., Ishikawa, K., Yamada, H., Aiba, H., und Mizuno, T.** (2001). The Arabidopsis sensor His-kinase, AHk4, can respond to cytokinins. *Plant and Cell Physiology*, **42**, 107–113.
- Suzuki, T., Sakurai, K., Imamura, A., Nakamura, A., Ueguchi, C., und Mizuno, T.** (2000). Compilation and characterization of histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in plants: AHP signal transducers of Arabidopsis thaliana. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 2486–2489.
- Szemenyei, H., Hannon, M., und Long, J. A.** (2008). TOPLESS Mediates Auxin-Dependent Transcriptional Repression During Arabidopsis Embryogenesis. *Science*, **319**, 1384–1386.
- Takei, K.** (2001). Identification of Genes Encoding Adenylate Isopentenyltransferase, a Cytokinin Biosynthesis Enzyme, in Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 26405–26410.
- Talbot, M. J. und White, R. G.** (2013). Cell surface and cell outline imaging in plant tissues using the backscattered electron detector in a variable pressure scanning electron microscope. *Plant Methods*, **9**, 40.
- Tao, Q., Guo, D., Wei, B., Zhang, F., Pang, C., Jiang, H., Zhang, J., Wei, T., Gu, H., Qu, L.-J., et al.** (2013). The TIE1 transcriptional repressor links TCP transcription factors with TOPLESS/TOPLESS-RELATED corepressors and modulates leaf development in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE*, **25**, 421–437.
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T., und Mesirov, J. P.** (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief. Bioinformatics*, **14**, 178–192.
- To, J. P. C., Haberer, G., Ferreira, F.J., Deruère, J., Mason, M.G., Schaller, G.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Kieber, J.J.** (2004). Type-A Arabidopsis Response Regulators Are Partially Redundant Negative Regulators of Cytokinin Signaling. *THE PLANT CELL ONLINE*, **16**, 658–671.
- To, J. P. C., Deruere, J., Maxwell, B. B., Morris, V. F., Hutchison, C. E., Ferreira, F. J., Schaller, G. E., und Kieber, J. J.** (2007). Cytokinin Regulates Type-A Arabidopsis Response Regulator Activity and Protein Stability via Two-Component Phosphorelay. *THE PLANT CELL ONLINE*, **19**, 3901–3914.
- Trapnell, C., Hendrickson, D. G., Sauvageau, M., Goff, L., Rinn, J. L., und Pachter, L.** (2013). Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat Biotechnol.*, **31**, 46–53.
- Trost, G., Vi, S. L., Czesnick, H., Lange, P., Holton, N., Giavalisco, P., Zipfel, C., Kappel, C., und Lenhard, M.** (2014). Arabidopsis poly(A) polymerase PAPS1 limits founder-cell recruitment to organ primordia and suppresses the salicylic acid-independent immune response downstream of EDS1/PAD4. *Plant J.*, **77**, 688–699.
- Tsai, M. J. und O'Malley, B. W.** (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 451–486.
- Udvardi, M. K., Czechowski, T., und Scheible, W.-R.** (2008). Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell*, **20**, 1736–1737.
- Ueguchi, C., Sato, S., Kato, T., und Tabata, S.** (2001). The AHK4 gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, **42**, 751–755.
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.-Y., Hsing, Y.-I. C., Kitano, H., Yamaguchi, I., et al.** (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, **437**, 693–698.

- Utan, G.** (2012). Plant stem cell control: Cell behavior and regulatory underpinnings, *Masterarbeit*
- van der Graaff, E., Laux, T., und Rensing, S. A.** (2009). The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. *Genome Biol.*, **10**, 248.
- van Dop, M., Liao, C.-Y., und Weijers, D.** (2015). Control of oriented cell division in the Arabidopsis embryo. *Current Opinion in Plant Biology*, **23**, 25–30.
- Vanstraelen, M. und Benková, E.** (2012). Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **28**, 463–487.
- Vernoux, T., Brunoud, G. E. R., Farcot, E., Morin, V. E. R., Van den Daele, H., Legrand, J., Oliva, M., Das, P., Larrieu, A., Wells, D., et al.** (2011). The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. *Molecular Systems Biology*, **7**, 1–15.
- Wang, Z., Zang, C., Cui, K., Schones, D. E., Barski, A., Peng, W., und Zhao, K.** (2009). Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell*, **138**, 1019–1031.
- Wangenheim, von, D., Daum, G., Lohmann, J. U., Stelzer, E. K., und Maizel, A.** (2014). Live imaging of Arabidopsis development. *Methods Mol. Biol.*, **1062**, 539–550.
- Wanke, D., Hohenstatt, M. L., Dynowski, M., Bloss, U., Hecker, A., Elgass, K., Hummel, S., Hahn, A., Caesar, K., Schleifenbaum, F., et al.** (2011). Alanine zipper-like coiled-coil domains are necessary for homotypic dimerization of plant GAGA-factors in the nucleus and nucleolus. *PLoS ONE*, **6**, e16070.
- Ward, J. H. S. J. S.** (1963). Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association*, **58**, 236–244.
- Warnes, G. R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., Liaw, W. H. A., Lumley, T., Maechler, M., Magnusson, A., Moeller, S., Schwartz, M., Venables, B.** (2012). gplots: various R programming tools for plotting data. <http://CRAN.R-project.org/package=gplots>.
- Weigel, D. und Jürgens, G.** (2002). Stem cells that make stems. *Nature*, **415**, 751–754.
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D. R., Yanofsky, M. F., und Meyerowitz, E. M.** (1992). LEAFY controls floral meristem identity in Arabidopsis. *Cell*, **69**, 843–859.
- Weijers, D., Schlereth, A., Ehrismann, J. S., Schwank, G., Kientz, M., und Jürgens, G.** (2006). Auxin Triggers Transient Local Signaling for Cell Specification in Arabidopsis Embryogenesis. *Dev. Cell*, **10**, 265–270.
- Winter, C. M., Austin, R. S., Blanvillain-Baufumé, S., Reback, M. A., Monniaux, M., Wu, M.-F., Sang, Y., Yamaguchi, A., Yamaguchi, N., Parker, J. E., et al.** (2011). LEAFY target genes reveal floral regulatory logic, cis motifs, and a link to biotic stimulus response. *Dev. Cell*, **20**, 430–443.
- Wolters, H., Anders, N., Geldner, N., Gavidia, R., und Jürgens, G.** (2011). Coordination of apical and basal embryo development revealed by tissue-specific GNOM functions. *Development*, **138**, 117–126.
- Wu, X., Chory, J., und Weigel, D.** (2007). Combinations of WOX activities regulate tissue proliferation during Arabidopsis embryonic development. *Developmental Biology*, **309**, 306–316.
- Wu, X., Dabi, T., und Weigel, D.** (2005). Requirement of Homeobox Gene STIMPY/WOX9 for Arabidopsis Meristem Growth and Maintenance. *Current Biology*, **15**, 436–440.
- Wu, Z., Irizarry, R. A., Gentleman, R., Martinez-Murillo, F., und Spencer, F.** (2004). A Model-Based Background Adjustment for Oligonucleotide Expression Arrays. *Journal of the American Statistical Association*, **99**, 909–917.
- Xu, Y.-Y., Wang, X.-M., Li, J., Li, J.-H., Wu, J.-S., Walker, J. C., Xu, Z.-H., und Chong, K.** (2005). Activation of the WUS gene induces ectopic initiation of floral meristems on mature stem surface in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol.*, **57**, 773–784.

- Yadav, R. K., Girke, T., Pasala, S., Xie, M., Reddy, G. V.** (2009). Gene expression map of the Arabidopsis shoot apical meristem stem cell niche. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 4941–4946
- Yadav, R. K., Perales, M., Gruel, J., Girke, T., Jonsson, H., und Reddy, G. V.** (2011). WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot apex. *Genes & Development*, **25**, 2025–2030.
- Yadav, R. K., Perales, M., Gruel, J., Ohno, C., Heisler, M., Girke, T., Jönsson, H., und Reddy, G. V.** (2013). Plant stem cell maintenance involves direct transcriptional repression of differentiation program. *Molecular Systems Biology*, **9**, 654.
- Yadav, R. K., Tavakkoli, M., und Reddy, G. V.** (2010). WUSCHEL mediates stem cell homeostasis by regulating stem cell number and patterns of cell division and differentiation of stem cell progenitors. *Development*, **137**, 3581–3589.
- Yadav, R. K., Tavakkoli, M., Xie, M., Girke, T., und Reddy, G. V.** (2014). A high-resolution gene expression map of the Arabidopsis shoot meristem stem cell niche. *Development*, **141**, 2735–2744.
- Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., Yamashino, T., Mizuno, T.** (2001). The Arabidopsis AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant and Cell Physiology* **42**: 1017–1023.
- Yamaguchi, N., Winter, C. M., Wu, M.-F., Kanno, Y., Yamaguchi, A., Seo, M., und Wagner, D.** (2014). Gibberellin acts positively then negatively to control onset of flower formation in Arabidopsis. *Science*, **344**, 638–641.
- Yamaguchi, N., Wu, M.-F., Winter, C. M., Berns, M. C., Nole-Wilson, S., Yamaguchi, A., Coupland, G., Krizek, B. A., und Wagner, D.** (2013). A molecular framework for auxin-mediated initiation of flower primordia. *Dev. Cell*, **24**, 271–282.
- Yanai, O., Shani, E., Dolezal, K., Tarkowski, P., Sablowski, R., Sandberg, G., Samach, A., und Ori, N.** (2005). Arabidopsis KNOX1 Proteins Activate Cytokinin Biosynthesis. *Current Biology*, **15**, 1566–1571.
- Yu, X., Li, L., Zola, J., Aluru, M., Ye, H., Foudree, A., Guo, H., Anderson, S., Aluru, S., Liu, P., et al.** (2011). A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, **65**, 634–646.
- Zhang, Fei, Wang, Y., Li, G., Tang, Y., Kramer, E. M., und Tadege, M.** (2014). STENOFOLIA recruits TOPLESS to repress ASYMMETRIC LEAVES2 at the leaf margin and promote leaf blade outgrowth in Medicago truncatula. *THE PLANT CELL ONLINE*, **26**, 650–664.
- Zhang, Hanma, Han, W., De Smet, I., Talboys, P., Loya, R., Hassan, A., Rong, H., Jürgens, G., Paul Knox, J., und Wang, M.-H.** (2010). ABA promotes quiescence of the quiescent centre and suppresses stem cell differentiation in the Arabidopsis primary root meristem. *Plant J.*, **64**, 764–774.
- Zhang, Wenli, Zhang, T., Wu, Y., und Jiang, J.** (2012). Genome-wide identification of regulatory DNA elements and protein-binding footprints using signatures of open chromatin in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE*, **24**, 2719–2731.
- Zhang, Yong, Liu, T., Meyer, C. A., Eeckhoutte, J., Johnson, D. S., Bernstein, B. E., Nusbaum, C., Myers, R. M., Brown, M., Li, W., et al.** (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol*, **9**, R137.
- Zhang, Yu, Mayba, O., Pfeiffer, A., Shi, H., Tepperman, J. M., Speed, T. P., und Quail, P. H.** (2013). A quartet of PIF bHLH factors provides a transcriptionally centered signaling hub that regulates seedling morphogenesis through differential expression-patterning of shared target genes in Arabidopsis. *PLoS Genet*, **9**, e1003244.
- Zhao, Y.** (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **61**, 49–64.
- Zhao, Z., Andersen, S. U., Ljung, K., Dolezal, K., Miotk, A., Schultheiss, S. J., und Lohmann, J. U.** (2010). Hormonal control of the shoot stem-cell niche. *Nature*, **465**, 1089–1092.

**Zhou, Y., Liu, X., Engstrom, E. M., Nimchuk, Z. L., Pruneda-Paz, J. L., Tarr, P. T., Yan, A., Kay, S. A., und Meyerowitz, E. M.** (2015). Control of plant stem cell function by conserved interacting transcriptional regulators. *Nature*, **517**, 377–380.

**Zhu, J.-K.** (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **53**, 247–273.

**Zürcher, E., Tavor-Deslex, D., Lituiev, D., Enkerli, K., Tarr, P. T., und Müller, B.** (2013). A robust and sensitive synthetic sensor to monitor the transcriptional output of the cytokinin signaling network in planta. *PLANT PHYSIOLOGY*, **161**, 1066–1075.

## DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Jan Lohmann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und Betreuung der Arbeit. Er hat mir größtmögliche Freiheit in der Forschung gewährt und es mir ermöglicht, mich weiter zu entwickeln. Auch in kritischen Phasen der Doktorarbeit hat er mir und meinen Fähigkeiten stets Vertrauen geschenkt.

Ich danke den Mitgliedern meiner Prüfungskommission, Prof. Dr. Jochen Wittbrodt, Prof. Dr. Thomas Holstein und Dr. Thomas Greb, dass sie sich Zeit genommen haben, meine Arbeit zu lesen und zu bewerten.

David Ibberson danke ich für die Herstellung der qualitativ hochwertigen Sequenzierbibliotheken und die Durchführung der Sequenzierungen, sowie der Unterstützung bei technischen Problemen.

Dem gesamten COS Heidelberg und insbesondere den ehemaligen und aktuellen Kollegen des JLab danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und den regen Austausch. Alle waren sehr hilfsbereit beim Lösen von Problemen und jederzeit ansprechbar.

Ganz besonders erwähnen möchte ich Katja Piiper, die sich aufopferungsvoll im Hintergrund um die Pflanzen gekümmert hat und sichergestellt hat, dass alle Materialien zur Verfügung stehen. Ohne sie wäre die Arbeit praktisch nicht möglich gewesen. Dr. Anna Medzihradzky danke ich für die Durchführung aller *in situ* Hybridisierungen in dieser Arbeit und Dr. Gabor Daum für die Unterstützung in der konfokalen Mikroskopie.

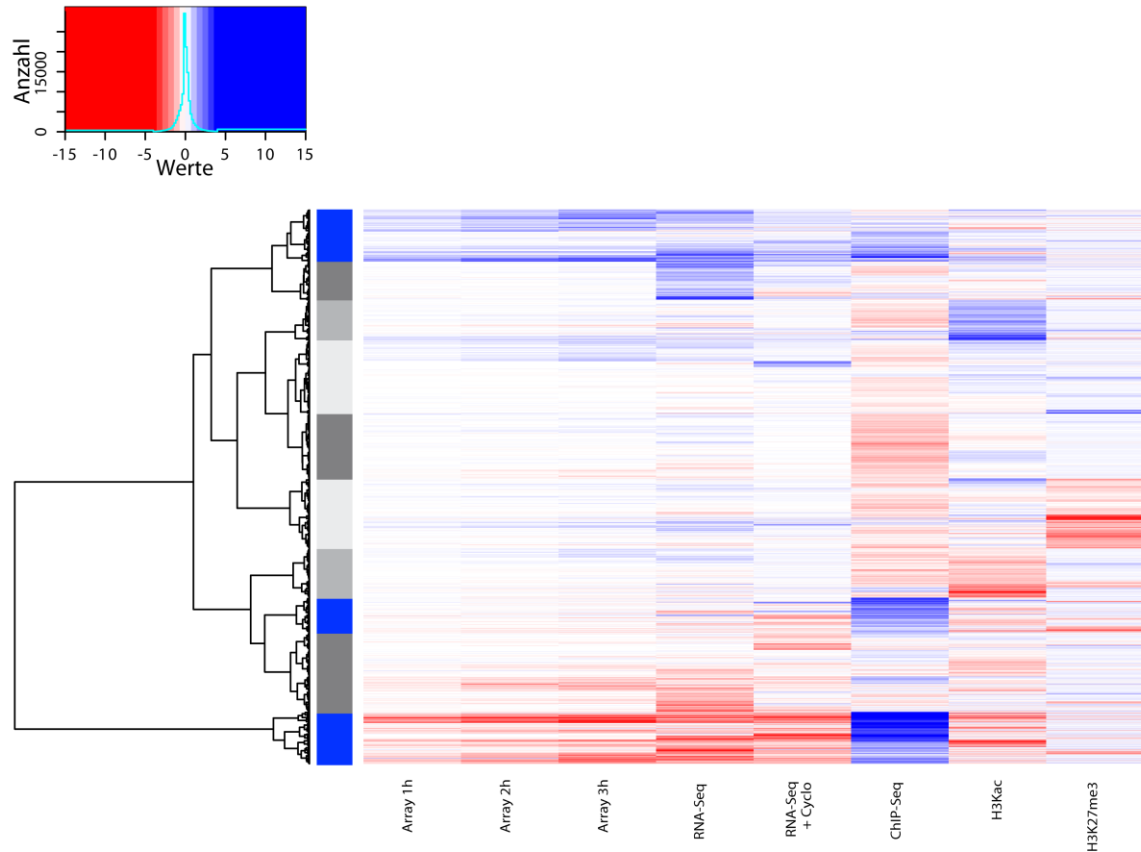
Abschließend möchte ich denen danken, die mir überhaupt erst ermöglicht haben diese Arbeit zu schreiben. Meine Eltern haben mich während des gesamten Studiums und der Doktorarbeitszeit hindurch unterstützt und mich motiviert. Ohne meine Freundin Stefanie hätte ich die Arbeit nicht erfolgreich abschließen können. Sie hat mich auch durch die schweren Zeiten begleitet. Für ihre Opferbereitschaft und ihre Energie danke ich ihr. Sie ist fraglos das beste was ich während meiner Doktorarbeit gefunden habe!

## ANHANG

### Übersicht

- **Anhang1:** Hierarchisch geclusterte Heatmap des WUS-Effekts auf Transkriptom und Epigenom
- **Anhang2:** Liste der in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide
- **Anhang3 (nur digital):** Effekt von Behandlung auf Hormon-Reporter
- **Anhang4 (nur auf beiliegender CD):** Datensätze der Arbeit

## Anhang 1



**Anhang 1:** Heatmap einer hierarchischen Clusteranalyse der Veränderungen im Transkriptom und Epigenom nach WUS-Induktion. Blau markierte Cluster repräsentieren direkte WUS-Zielgene. Array 1h-3h, RNA-Seq und RNA-Seq + Cyclo: Expressionsveränderungen (log2) im jeweiligen Experiment. ChIP-Seq: normalisierte Anzahl an Tags pro Base im Promoterbereich für WUS-GR. H3ac: normalisierte Anzahl an Tags pro Base über das Gen für Histon 3 Acetylierung. H3K27me3: normalisierte Anzahl an Tags pro Base über das Gen für Histon 3 Lysin 27 Dreifachmethylierung.

## **Anhang 2**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden in der Datenbank des Labors hinterlegt. Sie sind mit Verwendungszweck nachfolgend aufgelistet.



Oligo	Alias	Gen	Sequenz	Länge	Verwendungszweck
A00014	G-22393	pMAL	GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC		24 sequencing insert in pMAL expression vectors
A00015		pHMAL	CCTTTATCGCCGTTAATCCA		20 sequencing of N-terminal addition of 6xHis in pMAL vectors
A00016		pHMAL	ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACGGTATAAAAATCGAAGA AGGTAAACTGG		58 addition of 6xHis-Tag N-terminal to MBP-Tag to be used in site directed mutagenesis with A00017
A00017		pHMAL	tATACCGTGATGATGATGATGATGGCTGCTGCCATATGCTATGGTCC TTGTTGGTG		57 addition of 6xHis-Tag N-terminal to MBP-Tag to be used in site directed mutagenesis with A00016
A00118	PI	Hsf1	GCTATCCACAGGTTAGATAAAGGAG		25 qPCR after ChIP
A00119		Hsf1	GAGAAAGATTGTGTGAGAATGAAA		24 qPCR after ChIP
A00120		b-Tubulin2	tgtctaagcttacacatacttgga		25 qPCR on Tubulin locus
A00128		FT	tatagcatagctcaaacatgttgct		26 qPCR on FT potential internal standard for H3K27me3 profiling
A00129		FT	tccaaaatacatgtccagtttaca		25 qPCR on FT potential internal standard for H3K27me3 profiling
A00130		AP3	accaacatttgagaaaaacagaaag		25 qPCR on AP3 potential internal standard for H3K27me3 profiling
A00131		AP3	gcagAACAAAAGTCAACAAGACATA		25 qPCR on AP3 potential internal standard for H3K27me3 profiling
A00232		Pistillata	TGAAGAAGGCTAAAGAGATCACAGT		25 qPCR Primer for use in ChIP
A00233		Pistillata	GGAAGGACAACAGTAATCAATCATC		25 qPCR Primer for ChIP
A00287		WUS	CCAAGACCATCATCTCTATCATCA		24 qRT-PCR
A00288		WUS	ATGATCCATGTTTGCCCATC		21 qRT-PCR
A00289		LFY	AGTTCCTTCTTCAGGTCCAGACAATTG		27 qRT-PCR
A00290		LFY	CTTCTTCGTCTAGGCAGTGGAGAGCGT		27 qRT-PCR
A00291		AG	AGATTAGAGAGAAGTATTACCCGAATC		27 qRT-PCR
A00292		AG	GTCTTGCGGACCCGCGGATGAGTAATG		27 qRT-PCR
A00665		Gateway	CACATTATACGAGCCGGAAGCAT		23 Sequencing of promoters in Gateway
A00810		CLV3	TCTCTAAAAATGGATTCTGAAGAGTTT		27 for qPCR
A00811		CLV3	GTGAAAGAGAGAGTGAGACCAGAAG		25 for qPCR
A00812		WUS	TTGTTTTCTTGCTAACTTCAAACCTC		26 for qPCR
A00813		WUS	GTGTTTGATTGACTTTTGTTTAC		24 for qPCR
A00814		STM	GTGTCCTATGATGATGATGATGC		23 for qPCR
A00815		STM	TAACCATCATGTTCTTGTTGTTGAT		25 for qPCR
A00816		3xVENUS YFP	CTGGACGGCGACGTAAAC		18 for qPCR
A00817		3xVENUS YFP	AGATCAGCTTCAGGGTCAGCTT		22 for qPCR
A00818		ML1	CGATCTAAAACCTCAAGAAACCAAA		25 for qPCR
A00819		ML1	ACTCGAGTCGAAAGAAAAGATTAA		26 for qPCR
A00823		b-Tubulin2	AAACACAGAGAGGAGTGAGCAA		22 for qPCR

Oligo	Alias	Gen	Sequenz	Länge	Verwendungszweck
A00824		b-Tubulin2	ATCGAAATCCGAGATTAAAGG		22 for qPCR
A00825	ACT2	Actin2	CGGCGACTTGACAGAGAAG		19 for qPCR on ACT2 cDNA
A00826	ACT2	Actin2	GAGGAAGATTCAAAACGGAGAA		22 for qPCR on ACT2 cDNA
A00827	H2B	Histone 2B	cgaggtcgacatggcgccgaaggcagagaa		30 amplify H2B (At5G02570) and add SmaI site at the beginning
A00828	H2B	Histone 2B	CGGGGTACCCAGAGCTTGTGAATTTGGTGA		30 amplify H2B (At5G02570) and add KpnI site at the end
A00869	ACT2	Actin2	TCTTCCGCTCTTTCTTTCCA		20 qPCR on ACT2
A00870	ACT2	Actin2	TCACCATACCGGTACCATTG		20 qPCR on ACT2
A00871	ACT2	Actin2	TGGATTTGCAGGAGATGATG		20 qPCR on ACT2
A00872	ACT2	Actin2	TTCTGGTTCATCCCAACCAT		20 qPCR on ACT2
A00896			CCAAAGCCGTCACCAAATTCACAAGCTCTGGGTAC		35 replace linker in pDRE32
A00897			CCAGAGCTTGTGAATTTGGTGACGGCTTTGGTAC		34 exchange linker in pDRE32
A00924	CLV1	CLV1 promoter	agttatataatccgacggcggtt		23 qPCR over CLV1 promoter binding site of WUS protein
A00925	CLV1	CLV1 promoter	aagcccatttacttctctcttg		23 qPCR over CLV1 promoter WUS binding site
A00939		AVP1	ccctaaactcaacgaccaagat		22 for qPCR on AVP1WUS binding site
A00940		AVP1	ccgaatttagattcatctcatcta		25 for qPCR on AVP1WUS binding site
A00941		AVP1	taccggatagatgaggatgaatcta		25 for qPCR on AVP1WUS binding site
A00942		AVP1	gtttttacgctacaccatcagaact		25 for qPCR on AVP1 WUS binding site
A00971		ML1 promoter	gtgatataattctaccttctctgg		24 to sequence from ML1 promoter
A01027		GFP NLS	TTGCTGCAGCGCCGAATTC AAGCGTG		27 for sequencing out of NLS
A01067	Ref1-F	AT1G13320	TAACGTGGCCAAAATGATGC		20 qRT-PCR Reference1 to be used with A01068 creates 60bp product
A01068	Ref1-R	AT1G13320	GTTCTCCACAACCGCTTGGT		20 qRT-PCR reference1 to be used with A01067 creates 60bp product
A01069	Ref2-F	AT4G26410	GAGCTGAAGTGGCTTCCATGAC		22 qRT-PCR reference2 to be used with A01070 creates 80bp product
A01070	Ref2-R	AT4G26410	GGTCCGACATACCATGATCC		21 qRT-PCR reference 2 to be used with A01069 creates 80bp product
A01071	Ref3-F	AT4G34270	GTGAAAACGTGTGGAGAGAAGCAA		24 qRT-PCR reference3 to be used with A01072 creates 60bp product
A01072	Ref3-R	AT4G34270	TCAACTGGATACCTTTTCGCA		21 qRT-PCR reference 3 to be used with A01071 creates 60bp product
A01073	Ref4-F	AT5G15710	TTTCGGCTGAGAGGTTTCAGT		21 qRT-PCR reference 4 to be used with A01074 creates 60bp product
A01074	Ref4-R	AT5G15710	GATTCCAAGACGTAAAGCAGATCAA		25 qRT-PCR reference 4 to be used with A01073 creates 60bp product
A01092		AT1G35750	GATCGCGGCCGCTTACACCTGCTGGGCCAAT		31 PCR product of distal promoter of APUM10
A01093		AT1G35750	ATGCGGATCCTATTTATGGGGTTGCGAGATA		31 PCR product of distal promoter of APUM10
A01094		AT1G35750	GATCGGATCCCATTTAATAAAAAGATGG		30 PCR product of distal terminator of APUM10
A01095		AT1G35750	GTACGGTACCAAATTTTAAAGATTGAAATG		30 PCR product of distal terminator of APUM10
A01096		gateway	tgcttttgacctaattgttgagagagattaatggggttcgaggttgcACAAGTTT GTACAAAAAAGCTGAACG		76 for homologous recombination of gateway cassette into APUM10 CDS

Oligo	Alias	Gen	Sequenz	Länge	Verwendungszweck
A01097		gateway	atccgattttaatacacaaaatatcgcagtttttagacactaatcaaagACCACTTT GTACAAGAAAGCTGAACG	76	homologous recombination of gateway cassette with APUM10 CDS
A01098	APUM10	AT1G35750	ATGGAGATTTTAACTTCGGACAAGC	26	clone CDS of APUM10
A01099	APUM10	AT1G35750	TTACTTCTTCAAGATGGTCTTGGAG	25	cloning of APUM10 CDS
A01130	AG	AGAMOUS	CTCTGTTCTTTGTGATGCTGAAGT	24	qPCR on genomic AG
A01131	AG	AGAMOUS	cgagaagaagaagaaacCTGTTGT	24	qPCR on genomic AG
A01249	AG	AGAMOUS	aatactatcaaatgtctattggattt	27	checking WUS-binding site in AG 2nd intron
A01250	AG	AGAMOUS	gaacatgtctagggttcagacat	24	checking WUS-binding site in AG 2nd intron
A01529		pGREEN-II	GCTCCTGAAAATCTCGACGGCTCC	24	sequence promoters reverse in pGREEN II
A01566		CDB (cyclin destruction box)	ggaaacaATGCGTCAAGTTCTTGGTGATATAGGTAATgccgc	42	insertion of CDB in front of NTF at SacII site
A01567		CDB (cyclin destruction box)	ggcATTACCTATATCACCAAGAACTTGACGCATgtttccGC	42	insertion of CDB in front of NTF at SacII site
A01568		CDB (cyclin destruction box)	gatccaaacaATGCGTCAAGTTCTTGGTGATATAGGTAATg	41	insertion of CDB in front of YFP at BamHI site
A01569		CDB (cyclin destruction box)	GATCcATTACCTATATCACCAAGAACTTGACGCATgtttg	41	insertion of CDB in front of YFP at BamHI site
A01570		CDB (cyclin destruction box)	tcgagaaacaATGCGTCAAGTTCTTGGTGATATAGGTAATcgc	43	insertion of CDB in front of H2B at XhoI site
A01571		CDB (cyclin destruction box)	TCGAgcgATTACCTATATCACCAAGAACTTGACGCATgttttc	43	insertion of CDB in front of H2B at XhoI site
A01572		UFO promoter	CATATGATCTTTGCCTCTTTTCCTA	25	for sequencing out of UFO promoter
A01573		ANT promoter	TTTTTGCTGTCATCAGTTGTATTGT	25	for sequencing out of ANT promoter
A01589		At4G12980	AGCGATATAAGCCGTCTTGTAAGTA	25	positive control for H3K27me3 ChIP on CLV3 cells
A01590		At4G12980	TACTCTATCCTCATCCTTGGAATCA	25	positive control for H3K27me3 ChIP on CLV3 cells
A01591		At3G49300	ttatgcataggtttcaacgtagat	25	positive control for H3K27me3 ChIP on CLV3 cells
A01592		At3G49300	ccatatgattttcctacatctaca	25	positive control for H3K27me3 ChIP on CLV3 cells
A01614		ARR6	TGCTACCGAGGAAGATGGAGA	21	
A01615		ARR6	TCCGGTGATCCAAACTTTGAA	21	
A01681			GTTAAGAACAAATCAACTCCTCCAG	25	negative control for H3K27me3 ChIP
A01682			CATCTGAGAGTCAATTTGGGAAATA	25	negative control for H3K27me3 ChIP
A01683			AATGAAGCTCATGGATCTAAACTTG	25	positive control for H3K27me3 ChIP
A01684			AGAATGTTAACCAGCAGAGGAGAC	24	positive control for H3K27me3 ChIP

Oligo	Alias	Gen	Sequenz	Länge	Verwendungszweck
A01685			AAATTACCAATTGACCAGAGGTCTT	25	positive control for H3K27me3 ChIP
A01686			TGCTTGATAGATTTAGACTGTGGA	25	positive control for H3K27me3 ChIP
A01687			tatgtagagctgcttattggtggt	25	negative control for H3K27me3 ChIP
A01688			gtaaatattgatggcaaaagacgag	25	negative control for H3K27me3 ChIP
A01689			TGTAAACTGTCCGAGATGTAACCA	25	positive control for H3K27me3 ChIP
A01690			TACAACCTTTGCAGAAGTATCTTGG	25	positive control for H3K27me3 ChIP
A01691		STM	TAGAGAGAGGGATTGAATTGACAC	25	conditional control for H3K27me3 ChIP not repressed in SAM, strongly repressed in rest of seedling
A01692		STM	GTTAAGTATGAGCAAGAGCTCTCCA	25	conditional control for H3K27me3 ChIP not repressed in SAM, strongly repressed in rest of seedling
A01826			GCATTAGCGGCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGCTGGA GAAAAAAAAAAAAAAAAA	62	LinDA Oligo for linear amplification of ChIP material as in Shankaranarayanan et al. 2011
A01836	pT7-Bpml-dA15		GCATTAGCGGCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGCTGGA GAAAAAAAAAAAAAAAAAB	63	LinDA oligo with added B
A01840			GACATGTATCCGGATGTNNNNNNNNNN	26	for nano-ChIP-seq linear DNA amplification
A01841			GACATGTATCCGGATGT	17	for nano-ChIP-seq linear DNA amplification
A01880			GCATTAGCGGCCGCGAAATTAATAC	25	PCR amplify LinDA products after T-tailing and incorporation of A01826
A02167		ARR7	tgtttgacacttatttaggatcgt	25	to test ChIP on WUS-GR
A02168		ARR7	ctaacgaattgcaaggaggactaag	25	for ChIP on WUS-GR
A02169		AG	aatactatcaaatgtctattggattt	26	for ChIP on WUS-GR
A02170		AG	gaacatgtctagggttcagacat	24	for ChIP on WUS-GR
A02340	UCN	At1G51170	GTATATCATATAAGATTCAAACCTCT	25	check for WUS binding in UCN promoter
A02341		At1G51170	CAATGGTTCTGTAATTTATTTTAT	25	check for WUS binding in UCN promoter
A02342		At1G51170	tatttctctggactgttctctgctt	25	check for WUS binding in UCN promoter
A02343		At1G51170	gtgactgatccatcatcataacttg	25	check for WUS binding in UCN promoter
A02344		At1G51170	gtcgacacaattgccctctatt	22	check for WUS binding in the UCN promoter
A02345		At1G51170	ttcctccaatacatctaaagat	25	check for WUS binding in UCN promoter
A02747		CLV1	AGTGTCAGAAGCTTCAAGATCAACC	25	control oligo for qPCR on WUS ChIP within CLV1 CDS
A02748		CLV1	AAGGTTTTGAATATCTCCAACAATG	25	control Oligo for qPCR on WUS ChIP within CLV CDS
A02749		ARR7	ttaacagaatggtttgctaaggtc	25	control Oligo for qPCR on WUS ChIP withing ARR7 CDS
A02750		ARR7	GTTCAAACGAATGAAATCAGAATC	25	control Oligo for qPCR on WUS ChIP within ARR7 CDS
A02943		At2g21300	AAGATCTCTTTCTCGTTCAGAGGTC	25	Zhou et al. 2010 (Plant Mol Biol.) H3K9ac positive control

Oligo	Alias	Gen	Sequenz	Länge	Verwendungszweck
A02944		At2g21300	GAAGAAAATGGAGAAGACACAGGT	24	Zhou et al. 2010 (Plant Mol Biol.) H3K9ac positive control
A02945		At2g05920	AGTTTGAGGAGGAGAGGAGAGAATC	25	Zhou et al. 2010 (Plant Mol Biol.) H3K9ac positive control
A02946		At2g05920	CTCTTCTCTACACTTACACAACCTCT	27	
A02947		At2g13360	ATAACGTGTTGGTCAAGGCACT	22	Zhou et al. 2010 (Plant Mol Biol.) H3K9ac positive control
A02948		At2g13360	AGAAGATATTCAAGACCACATCAGG	25	Zhou et al. 2010 (Plant Mol Biol.) H3K9ac positive control
A02949		At4g14630	ttttgtcttctacaaatcgtctcc	25	Zhou et al. 2010 (Plant Mol Biol.) H3K9ac negative control
A02950		At4g14630	GTGTCAAAGCAAAGAGAGATAGAGC	25	Zhou et al. 2010 (Plant Mol Biol.) H3K9ac negative control
A02951		At4g14110	attaacaccacaaaatccacttcac	25	Zhou et al. 2010 (Plant Mol Biol.) H3K9ac negative control
A02952		At4g14110	TACTCTCATGCTTCAGgttcgtaat	25	Zhou et al. 2010 (Plant Mol Biol.) H3K9ac negative control
A02953		At3g14415	ttattggttttcacaagagaactga	25	Zhou et al. 2010 (Plant Mol Biol.) H3K9ac negative control
A02954		At3g14415	TTTTGTTACATCAATCAAAATCC	24	Zhou et al. 2010 (Plant Mol Biol.) H3K9ac negative control
A02955		At1g24560	GGAGCTAATAGCGGAGCTTG	20	Zhang et al. 2009 (Genome Biol.) #1
A02956		At1g24560	TCCTTCAATGCTTCATCACG	20	Zhang et al. 2009 (Genome Biol.) #1
A02957		At1g24560	GCACAGAGTTTGGTGGAAGAG	21	Zhang et al. 2009 (Genome Biol.) #2
A02958		At1g24560	CACCATCCCTCAAACCATTC	20	Zhang et al. 2009 (Genome Biol.) #2
A02959		At1g24560	GATTGGGAATTGCACTGAGG	20	Zhang et al. 2009 (Genome Biol.) #3
A02960		At1g24560	ATTGCTTGCTTTGCCTCTTC	20	Zhang et al. 2009 (Genome Biol.) #3
A02961		At1g24560	ACCAAGTCTAGCATGGGAGAGA	22	Zhang et al. 2009 (Genome Biol.) #4
A02962		At1g24560	TCGAGGGTTTGATTTACATGG	21	Zhang et al. 2009 (Genome Biol.) #4
A02963		At1g71220	TGGCTCTGTTTCACATCTCG	20	Zhang et al. 2009 (Genome Biol.) #1
A02964		At1g71220	AGATCATGCGAAGGAATGCT	20	Zhang et al. 2009 (Genome Biol.) #1
A02965		At1g71220	TGAGGCTGGGTAATGCTTCT	20	Zhang et al. 2009 (Genome Biol.) #2
A02966		At1g71220	AATCGGAATCATCTCCATCG	20	Zhang et al. 2009 (Genome Biol.) #2
A02967		At1g71220	TGAAGCAAGCTCCATGTTTG	20	Zhang et al. 2009 (Genome Biol.) #3
A02968		At1g71220	GTGAACGTCGATGCAGATCA	20	Zhang et al. 2009 (Genome Biol.) #3
A02969		At1g71220	TGTGAATCCTGGTGTGAAAA	20	Zhang et al. 2009 (Genome Biol.) #4
A02970		At1g71220	TGCAGAAGAACACCGCATTA	20	Zhang et al. 2009 (Genome Biol.) #4
A03271		at1g29980	ATTCGTTTACGAACATTTGCATTAG	25	
A03272		at1g29980	GGAAGAAGATGCTAACGTCTACAAA	25	
A03426	ESE3		AAACGTCCCCTAGCCAGATTCTT	22	
A03427	ESE3		CTTTCGAGGCGTTAGACAGAG	21	
A03428	LBD38		GCCGGTTTAATGTCTTTCATCTC	23	
A03429	LBD38		AGTTCTCCACAAGCTTCGTATAG	24	

Oligo	Alias	Gen	Sequenz	Länge	Verwendungszweck
A03430		WRKY11	GTTCTCTTCATCCGATTTTCC	22	
A03431		WRKY11	CATGAGCACTCAGAGAGTTTCTCC	24	
A03432		KAN1	CAGGCTTGTTAGTGGTCTTAACAGT	25	
A03433		KAN1	CTTGAGCTCATGGATGTAAAAGACT	25	
A03434		KAN2	CCAGTCGTCTGAGTTATTATCTCCT	25	
A03435		KAN2	AACAGTGAAGACAACCGACAAAG	23	
A03436		KAN3	TTTTCAGTAGACTTGATGGTTCGAT	25	
A03437		KAN3	AATCAGTACTTGAGCTGATGGATGT	25	
A03867	BPC1	AT2G01930	TACGTGGATCCATGGACGATGATGGATTTCGCA	33	cloning BPC1 in pMAL-c2X
A03868	BPC1	AT2G01930	TACGTAAGCTTATCTGATCGTGACAACTTATTGGT	36	cloning of BPC1 in pMAL-c2X
A04242	HDA19	At4G38130	ATCGGCgGCcGcTcCaATGGATACTGGCGCAATTCGCTGGCGTCC	46	add NotI site in front of ATG
A04243		At4g38130	tCTAGAATTCTaTTATGTTTTAGGAGGAAACGCCTGCTCCGC	42	add EcoRI site after Stop
A04244		At4G38130	TGGAAAATAAGAAcTCTCGTCAGAT	25	site directed mutagenesis of internal EcoRI site
A04245		At4G38130	ATCTGACGAGAGtTCTTATTTTCCA	25	site directed mutagenesis of internal EcoRI site
A04246		AT1G15750	ATCGGCgGCcGcTcCaATGCTTCTCTTAGTAGAGAGCTCGTTTTC	46	add NotI site in front of ATG
A04247		AT1G15750	tCTAGAATTCTaTCATCTCTGAGGCTGATCAGATGCAGAGGC	42	add EcoRI site after Stop
A04248		AT1G15750	TGATTTTCACGAAcTCGGGAAATGC	25	site directed mutagenesis of internal EcoRI site
A04249		AT1G15750	GCATTTCCCGAgTTCGTGAAATCA	25	site directed mutagenesis of internal EcoRI site
A04300	RGA	AT2G01570	ACCTAATCTAATCGAAACTCATAGCT	26	for qRT-PCR
A04301	RGA	AT2G01570	ATGATGAAGAAGAAGTCCCGTGG	23	for qRT-PCR
A04302	GAI	AT1G14920	CAAAACCTAGATCCGACATTGAAGG	25	for qRT-PCR
A04303	GAI	AT1G14920	TGATGATGATGATGATGATCTCTCT	25	for qRT-PCR
A04304	GID1B	AT3G63010	tttggagactATGGCTGGTGGTAA	25	for qRT-PCR
A04305	GID1B	AT3G63010	CTTGAAATTGGAAATGAGGACCCAT	25	for qRT-PCR
A04322		amiR-RGA	gaTAAATGACCTACCAAAGCGAtctctctttgtattcc	40	artificial miR against RGA use with A04323,A04324,A04325
A04323		amiR-RGA	gaTCGCTTTGGTAGGTCATTTTAtcaaagagaatcaatga	40	artificial miR against RGA use with A04322,A04324,A04325
A04324		amiR-RGA	gaTCACTTTGGTAGGACATTTTtcacaggtcgtgatag	40	artificial miR against RGA use with A04322,A04323,A04325
A04325		amiR-RGA	gaAAAAATGTCCTACCAAAGTGAtcacatatatattcct	40	artificial miR against RGA use with A04322,A04323,A04324
A04326		amiR-RGA	gaTTCAATGACGTGTACTCGCTTtctctctttgtattcc	40	artificial miR against RGA use with A04327,A04328,A04329
A04327		amiR-RGA	gaAAGCGAGTACACGTCAATTGAAtcaaagagaatcaatga	40	artificial miR against RGA use with A04326,A04328,A04329
A04328		amiR-RGA	gaAAACGAGTACACGACATTGATtcacaggtcgtgatag	40	artificial miR against RGA use with A04326,A04327,A04329
A04329		amiR-RGA	gaATCAATGTCGTGTACTCGTTTtcatatatatattcct	40	artificial miR against RGA use with A04326,A04327,A04328
A04330		amiR-GAI	gaTTTAAAGATCGTACGCGCGTtctctctttgtattcc	40	artificial miR against GAI use with A04331,A04332,A04333

Oligo	Alias	Gen	Sequenz	Länge	Verwendungszweck
A04331		amiR-GAI	gaACGCCGCGTACGATCTTAAAAAtcaaagagaatcaatga	40	artificial miR against GAI use with A04330,A04332,A04333
A04332		amiR-GAI	gaACACCGCGTACGAACTTAAATtcacaggtcgtgatatg	40	artificial miR against GAI use with A04330,A04331,A04333
A04333		amiR-GAI	gaATTTAAGTTCGTACGCGGTGTtctacatatattcct	40	artificial miR against GAI use with A04330,A04331,A04332
A04334		amiR-GAI	gaTTTTAAGATCGTACCCGGCGTtctctctttgtattcc	40	artificial miR against GAI use with A04335,A04336,A04337
A04335		amiR-GAI	gaACGCCGGGTACGATCTTAAAAAtcaaagagaatcaatga	40	artificial miR against GAI use with A04334,A04336,A04337
A04336		amiR-GAI	aACACCGGGTACGAACTTAAATtcacaggtcgtgatatg	39	artificial miR against GAI use with A04334,A04335,A04337
A04337		amiR-GAI	gaATTTAAGTTCGTACCCGGGTGTtctacatatattcct	40	artificial miR against GAI use with A04334,A04335,A04336
A04338		pRS300 (amiRNA)	CTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAC	25	A Primer in pRS300
A04339		pRS300 (amiRNA)	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG	28	B Primer in pRS300
A04563		HDA19	AACAggtctctAGACCGTAGTGAGCGAGGA	30	removes first internal Eco31I site; clone linker HDA19 as D-module
A04564		HDA19	AACAggtctcGGTCTaCTTCAGCATATGCA	30	remove first internal Eco31I site; clone linker HDA19 as D-module
A04565		HDA19	AACAggtctcGACCACCAGCCAGTTGAT	30	remove second internal Eco31I site; clone linker HDA19 as D-module
A04566		HDA19	AACAggtctcGGTCTaCCATCACGCTAAGA	30	remove second internal Eco31I site; clone linker HDA19 as D-module
A04567		HDA19	aacaGGTCTCtgcagTTATGTTTATAGGAG	29	add DE-flank; clone linker HDA19 as D-module
A04568		WUS	AATTcGGTCTCaCTGAGTTagcACGagcCTCAAGAGAAGCGCAAGG GCGA	50	introduce ΔEAR into WUS C-module
A04569		WUS binding site TCACGTGA	catcgtcgtcaagttatggg	20	test alternative WUS binding site CAAGTT in EMSA
A04570		WUS binding site TCACGTGA	cccataacttgacgacgatg	20	test alternative WUS binding motive CAAGTT in EMSA
A04631		HDA19	AACAggtctcTGGTCaCCATCACGCTAAGA	30	replace A04566 which is wrong!
A04632		TIR1	ATGCAGAAGCGAATAGCCTTGTCGT	25	clone TIR1 CDS
A04633		TIR1	TTATAATCCGTTAGTAGTAATGATT	25	clone TIR1 CDS
A04634		monopteros	aacaGGTCTCaggctcaacaATGATGGCTTCATTGTCTTGTTG	45	clone MP as c-module
A04635		monopteros	aacaGGTCTCtAGACCCGCATATCGCCTTACGGTA	35	clone MP as c-module
A04636		monopteros	aacaGGTCTCGGTCTaAGCTCTCAGTTGGTATGAGATTG	40	clone MP as c-module
A04637		monopteros	aacaGGTCTCtAGACCGTTCAACTGAGTGTCAC	35	clone MP as c-module
A04638		monopteros	aacaGGTCTCGGTCTaAAGTTGACCAGTTCAGTCCCTTG	40	clone MP as c-module
A04639		monopteros	aacaGGTCTCtctgaTGAAACAGAAGTCTTAAGATCGTTA	40	clone MP as c-module
A04640		monopteros	aacaGGTCTCtctgaGGTTCGGACGCGGGGTGTCGAATT	40	clone MPΔIIIΔIV as c-module
A04641		TIR1	aacaGGTCTCaggctcaacaATGCAGAAGCGAATAGCCTTGTCGT	45	clone TIR1 as c-module
A04642		TIR1	aacaGGTCTCtAGACCATCGGTGGAGAAGCCTTCG	35	clone TIR1 as c-module
A04643		TIR1	aacaGGTCTCGGTCTaGCTGCTATCGCTGCCACTTGCAGG	40	clone TIR1 as c-module

Oligo	Alias	Gen	Sequenz	Länge	Verwendungszweck
A04644		TIR1	aacaGGTCTCcCTCGAGTCCGGTGCACCCGTTCA	35	clone TIR1 as c-module
A04645		TIR1	aacaGGTCTCCCGAGgCCAGAGAGCTGCCCTGTTGAGAGA	40	clone TIR1 as c-module
A04646		TIR1	aacaGGTCTCtctgaTAATCCGTTAGTAGTAATGATT	37	clone TIR1 as c-module
A04647		BDL	aacaGGTCTCaggctcaacaATGCGTGGTGTGTCAGAATTGGAGG	45	clone BDL with P74S as c-module
A04648		BDL	aacaGGTCTCaCCATCCTACCACTTGACTTGAACG	35	clone BDL with P74S as c-module
A04649		BDL	aacaGGTCTCGATGGtCACCAATTGGGTACACAGGATGA	40	clone BDL with P74S as c-module
A04650		BDL	aacaGGTCTCtctgaAACAGGGTTGTTTCTTTGTCTATCC	40	clone BDL with P74S as c-module
A04715		TIR1	TTTCTTCCTGCGAAGGCTTCTC	22	qRT-PCR
A04716		TIR1	CACTCTCTCGTAAGTCAAGCTCTTT	25	qRT-PCR
A04717		ARF3	TTCTGTCGATTCTCGATGTTAAGC	25	qRT-PCR
A04718		ARF3	CTGACTCAGGAAGAAGAGAGACTTG	25	qRT-PCR
A04719		ARF4	GATGAGGTCTACACTCAAGTCACTC	25	qRT-PCR
A04720		ARF4	CTCCTAACTCCTTGACCTCTTTCC	24	qRT-PCR
A04721		monopteros	ACAACAACATCTCAATCTACCTTGC	25	qRT-PCR
A04722		monopteros	CTCCGAGTTATTACCGGCTTTCTT	25	qRT-PCR
A04723		monopteros	TGATCCCTCTAGCTAAGTACCGTAA	25	Sequencing
A04724		ARF8	CAAGGGATCTCCATGATGTTGAATG	25	qRT-PCR
A04725		ARF8	CACTCCATCCAGTAGTTAGGAGATG	25	qRT-PCR
A04726		mutated WUS binding site	catcgtcgtTaaAttatggg	20	use as negative control probe for WUS EMSA
A04727		mutated WUS binding site	cccataaTttAacgacgatg	20	use as negative probe in WUS EMSA